

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**Mgr. Šárka Šantorová**

Analýza volných nukleových kyselin v moči urologických pacientů

Analysis of cell-free nucleic acids in urine of urological patients

Dizertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24.4.2019

ŠÁRKA ŠANTOROVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

ŠANTOROVÁ, Šárka. Analýza volných nukleových kyselin v moči urologických pacientů. [*Analysis of cell-free nucleic acids in urine of urological patients*]. Praha, 2019. 120 s., 2 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky. Školitelka Korabečná, Marie.

## Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Korabečné, Ph.D. za odborné rady, vedení a čas věnovaný pomoci při vypracovávání této práce.

Velký dík patří všem lékařům a sestrám z VFN i FNM za odběr vzorků a odbornou spolupráci při psaní publikací. Ráda bych poděkovala i všem pacientům a kontrolám, za ochotu poskytnout vzorky do výzkumu.

Ing. Hořínkovi a MUDr. Evě Pazourkové děkuji za odborné vedení v laboratoři i všem ostatním z Laboratoře molekulární diagnostiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky za pomoc při řešení problémů během práce. MUDr. Evě Pazourkové a Ing. Michalu Huptychovi bych chtěla velmi poděkovat za pomoc se statistickým zpracováním dat.

Také nemohu zapomenout na rodinu, která mě podporovala po celou dobu studia i psaní této práce.

## Obsah

Abstrakt .....	1
Abstract .....	3
I Úvod .....	5
II Literární přehled .....	7
II.1 miRNA .....	7
II.1.1 Nomenklatura microRNA .....	7
II.1.2 Biogeneze miRNA .....	9
II.1.3 Funkce microRNA .....	12
II.2 Volná DNA .....	14
II.2.1 Původ cfDNA .....	17
II.2.2 cfDNA a malignity .....	17
II.2.3 cfDNA v moči .....	18
II.3 Rakovina močového měchýře .....	19
II.3.1 Diagnostika a klasifikace rakoviny močového měchýře .....	20
II.3.2 miRNA v moči jako diagnostický marker .....	22
II.3.3 cfDNA v moči jako diagnostický marker .....	28
III Cíle práce: .....	30
IV Materiál a metody .....	31
IV.1 Soubory vzorků .....	31
IV.1.1 Soubor vzorků pro studium miRNA v supernatantu moči .....	31
IV.1.2 Soubor vzorků pro studium cfDNA v supernatantu moči .....	32
IV.2 Zpracování moči .....	33
IV.3 Izolace miRNA z moči .....	33
IV.4 Izolace cfDNA z moči .....	34

IV.5 Reverzní transkripce miRNA.....	36
IV.5.1 Reverzní transkripce pro array technologii.....	36
IV.5.2 Reverzní transkripce pro jednotlivé assaye .....	37
IV.6 Preamplifikace miRNA.....	38
IV.7 Real-time PCR.....	39
IV.7.1 Relativní kvantifikace miRNA .....	39
IV.7.2 Absolutní kvantifikace cfDNA.....	41
IV.7.3 Statistická analýza dat.....	42
IV.7.4 Bioinformatická analýza výsledků .....	43
V    Výsledky .....	44
V.1 miRNA v moči .....	44
V.1.1 První fáze .....	44
V.1.2 Druhá fáze studie miRNA v močovém supernatantu.....	52
V.1.3 Třetí fáze studie miRNA v močovém supernatantu .....	55
V.2 cfDNA v moči .....	59
V.2.1 Výběr vhodného času pro odběr moči.....	60
V.2.2 Porovnání celkového množství močové cfDNA u pacientů a kontrol.....	65
VI    Diskuze .....	70
VI.1 miRNA v moči .....	70
VI.2 cfDNA v moči .....	75
VII   Závěr .....	79
VII.1 Seznam publikací.....	81
VII.1.1 Publikace které jsou podkladem dizertační práce: .....	81
VII.1.2 Publikace, které nejsou podkladem dizertační práce: .....	81

VIII	Seznam zkratek: .....	82
IX	Seznam literatury .....	84
X	Dodatek .....	101
XI	Přílohy .....	113
	XI.1 Publikace které jsou podkladem dizertační práce .....	113

## Abstrakt

Ve dvou studiích zabývajících se volnými nukleovými kyselinami v moči byl hledán biomarker pro odlišení pacientů s rakovinou močového měchýře od kontrolní skupiny. Karcinom močového měchýře tvoří 4 % nově diagnostikovaných onkologických onemocnění v České republice a zatím neexistuje dostatečně přesná neinvazivní metoda k jeho diagnostice. Supernatant moči, omývající sliznici močového měchýře, který neobsahuje buňky a jejich fragmenty, se zdá být vhodným zdrojem biomarkerů pro neinvazivní diagnostiku.

V jedné studii byly zkoumány miRNA, jako neinvazivní biomarkery rakoviny močového měchýře. miRNA jsou krátké nekódující RNA, které blokují translaci, vyskytují se ve všech tělních tekutinách a jsou velmi stabilní.

K nalezení vhodných markerů mezi miRNA byla provedena studie o třech částech. Ve všech třech částech bylo vyšetřeno celkem 109 jedinců (36 kontrol a 73 pacientů s rakovinou močového měchýře). Analýza miRNA byla založena na RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). V první fázi bylo vyšetřeno 59 jedinců TaqMan array kartami s 381 miRNA. V druhé fázi byly potvrzovány výsledky první fáze na stejném souboru jedinců jednotlivými assayemi pro 13 vybraných miRNA. Ve třetí fázi byl vyšetřen nový soubor jedinců (23 kontrol a 27 pacientů s rakovinou močového měchýře) opět assayemi pro jednotlivé miRNA. Výsledky všech tří fází byly normalizovány třemi miRNA vybranými algoritmem geNorm v programu qBase<sup>+</sup>®: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

Bylo nalezeno pět miRNA, které měly signifikantně sníženou expresi v supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře oproti kontrolám: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s miR-125b a miR-99a.

Tyto výsledky naznačují, že by hladiny miRNA mohly sloužit jako diagnostický marker k neinvazivní detekci rakoviny močového měchýře.



V druhé studii byly měřeny hladiny volné DNA (*cell-free* DNA – cfDNA) v močovém supernatantu jako biomarkeru rakoviny močového měchýře. Bylo vyšetřeno celkem 100 jedinců (34 kontrol a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře). U každého jedince byl zaznamenán objem moči a pomocí real-time PCR stanovena koncentrace cfDNA. Z těchto údajů bylo vypočteno celkové množství cfDNA. Bylo zjištěno, že druhá ranní moč je pro stanovení celkového množství cfDNA vhodnější než první ranní moč.

Byla navržena metodologie měření cfDNA v moči. Výpočet celkového množství cfDNA v druhé ranní moči dokázal odlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol ( $p=0,0002$ ).

Kvantifikace cfDNA v supernatantu moči má při dodržení metodologických postupů potenciál sloužit jako neinvazivní diagnostický marker rakoviny močového měchýře.

**Klíčová slova:** miRNA, cfDNA, moč, rakovina močového měchýře, neinvazivní marker

## Abstract

The two studies follow free nucleic acids in urine in search for biomarkers to distinguish urinary bladder cancer patients from controls. Bladder cancer forms 4 % of newly diagnosed oncological diseases in the Czech Republic. Nowadays, there is no accredited non-invasive method for its diagnosis, which is sufficiently accurate. Urine supernatant, which is washing the bladder mucosa and which does not contain cell debris, seems to be an appropriate source of biomarkers for non-invasive diagnosis.

miRNAs, as a non-invasive biomarker of urinary bladder cancer, were studied in one of the studies. miRNAs are short noncoding RNA, which block the process of translation. miRNAs occur in all body fluids and are relatively stable.

A study with three phases was assessed to find a suitable miRNA marker. 109 individuals were examined in total (36 controls and 73 bladder cancer patients). The analysis of miRNAs was based on RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). In the first phase, the urine of 59 individuals was analyzed on TaqMan array card with 381 miRNAs. In the second phase, the results of the first phase were confirmed on the same cohort by a single miRNA assay. In the third phase, a new cohort was used (23 controls and 27 bladder cancer patients), analyzed by a single miRNA assay again. All the results were normalized to three miRNAs, which were chosen by geNorm algorithm within the qBase<sup>+</sup> program: miR-191, miR-28-3p, and miR-200b.

Five miRNAs were found to be down-regulated in the urine supernatant of bladder cancer patients: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR 99a, and miR-532-3p. The best results were reached with miR-125b and miR 99a.

These results show that miRNA levels can be used as a diagnostic marker for non-invasive detection of bladder cancer.

Levels of cell-free DNA (cfDNA) as a biomarker for urinary bladder cancer were measured in the second study. Altogether, 100 individuals were examined (34 controls and 66 bladder cancer patients). The volume of each portion of voided urine was

recorded, and cfDNA concentration was measured by real-time PCR. This way the total amount of cfDNA was calculated. The second portion of morning urine was assessed as the better one for the calculation of cfDNA total amount than the first morning portion.

The methodology for measuring the cfDNA in urine was proposed. Calculation of the total cfDNA amount in the second morning urine is capable of distinguishing bladder cancer patients from controls ( $p=0.0002$ ).

When following correct methodological procedures, quantification of cfDNA in urine supernatant has the potential to serve as a non-invasive diagnostic marker for bladder cancer.

**Key words:** miRNA, cfDNA, urine, bladder cancer, non-invasive marker

## I Úvod

V této práci byly studovány rozdíly v expresi miRNA (podrobněji v oddílu III.1. Literárního přehledu) a koncentraci volné cirkulující DNA (cfDNA, *cell free DNA*) (oddíl III.2.) v supernatantu moči u pacientů s karcinomem močového měchýře (oddíl III.3) proti zdravým kontrolám i kontrolám s benigním onemocněním vylučovací soustavy.

Karcinom močového měchýře tvoří 4 % nově diagnostikovaných onkologických onemocnění v České republice. Jde o 11. nejčastěji diagnostikované maligní onemocnění ve světě. Rakovina močového měchýře postihuje třikrát častěji muže než ženy. Zatím neexistuje spolehlivé diagnostické neinvazivní vyšetření. Supernatant moči, omývající sliznici močového měchýře, který není zatížený buněčnými nukleovými kyselinami, se zdá být vhodným zdrojem biomarkerů pro neinvazivní diagnostiku.

miRNA jsou krátké nekódující RNA, které blokují translaci genu na základě komplementarity s částí příslušné mRNA, vyskytují se ve všech tělních tekutinách a jsou velmi stabilní. Ve studiích předcházejících naší studii bylo prokázáno, že při použití hladiny vybraných miRNA lze rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol.

cfDNA je DNA v tělních tekutinách, která není vázána v buňce. Její množství je zvýšeno při poškození tkání i při fyziologických stavech jako je zvýšená námaha a těhotenství. Množství cfDNA je u onkologických pacientů zvýšeno a u většiny pacientů po léčbě klesá. cfDNA lze k diagnostice využít několika způsoby: lze zjišťovat koncentraci cfDNA a její integritu, detekovat nádorově specifické mutace či charakterizovat stupeň metylace vybraných sekvencí přítomných v cfDNA. Na základě kvantifikace cfDNA v močovém supernatantu se rovněž podařilo odlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od zdravých jedinců.

**Poznámka:**

V práci je používáno spojení „exprese miRNA“ i když to *de facto* exprese není. Tento termín je použit v souladu s literaturou, kde běžně používán je, protože je využívána stejná metodika jako při studiu opravdové exprese.

Zároveň je v práci použito mnoho termínů a zkratk především z anglického jazyka, které nemají český ekvivalent a nejsou obvykle překládané do češtiny. Seznam zkratk je na straně 82.

## II Literární přehled

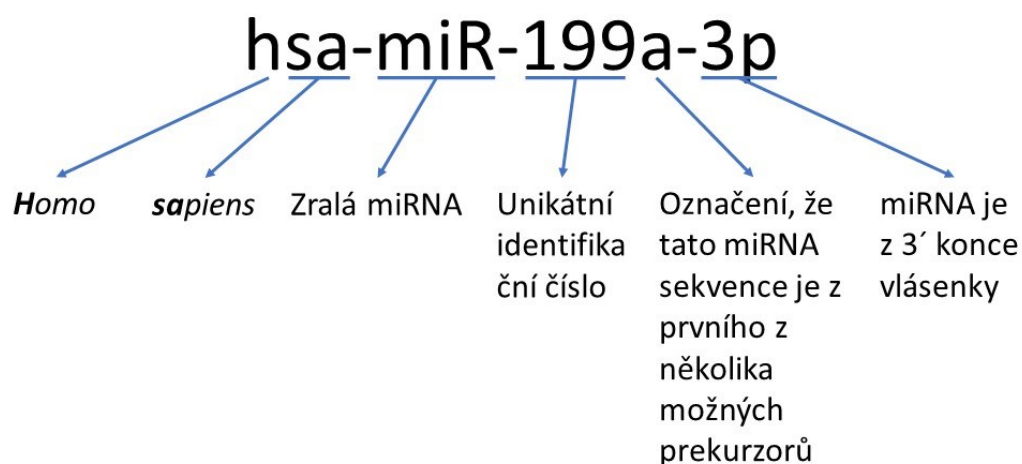
### II.1 miRNA

MicroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA, které byly objeveny v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* Leem a kol. (Lee, Feinbaum et al. 1993), kteří zjistili, že 22 nukleotidů dlouhé RNA blokuje translaci genu na základě komplementarity s částí příslušné mRNA (Wightman, Ha et al. 1993). Po sedmi letech byla charakterizována let-7 (Reinhart, Slack et al. 2000), miRNA, která je evolučně konzervována od bezobratlých po obratlovce (Pasquinelli, Reinhart et al. 2000). V dalších letech bylo objeveno mnoho dalších miRNA u rostlin i všech živočišných druhů včetně lidí (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001, Lau, Lim et al. 2001, Llave, Kasschau et al. 2002). Některé miRNA jsou exprimovány ve všech tkáních, jiné jsou tkáňově specifické (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001, Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2003).

#### II.1.1 Nomenklatura microRNA

Po zjištění, že microRNA tvoří úplně novou skupinu RNA, bylo potřeba sjednotit pravidla jejich pojmenovávání a označování. Shrnutí těchto pravidel popsali Ambros a kol. (Ambros, Bartel et al. 2003) a doplnil je Budak s kolegy (Budak, Bulut et al. 2015).

Zralá miRNA je značena zkratkou miR a unikátním číselným kódem, které jsou u živočichů odděleny pomlčkou. Čísla jsou přidělována postupně v rámci druhu, ale identické miRNA mají stejné číslo bez ohledu na organismus. Písmenné přípony značí blízkce příbuzné zralé miRNA sekvence exprimované z různých prekursorů, také odlišují členy rodiny (Obrázek 1). Za další pomlčkou může být ještě číselná přípona, která označuje zralé miRNA s identickou sekvencí uvnitř jednoho druhu. Dříve se předpokládalo, že duplex pre-miRNA tvoří *guide strand* a *passenger strand*. *Passenger strand* byl proto značen hvězdičkou (\*) na konci názvu (Ambros, Bartel et al. 2003, Budak, Bulut et al. 2015). Později bylo zjištěno, že *passenger strand* také může cílit na mRNA (Baev, Milev et al. 2014), a proto se začaly používat přípony -3p a -5p, podle toho ze kterého konce vlásenky miRNA vzniká (Budak, Bulut et al. 2015).



Obrázek 1: **Nomenklatura microRNA**

Geny pro miRNA se označují kapitálkami a kurzívou (*MIR*) a jsou pojmenovány po svých produktech. pre-miRNA se zapisuje kurzívou a pouze malými písmeny (*mir*-).

Pokud je potřeba rozlišit miRNA z různých živočichů, používá se před miR třípísmenná zkratka skládající se z jednoho písmene názvu rodu a dvou písmen názvu druhu (*Homo sapiens sapiens* – hsa-miR).

Let-7 a lin-4 patří mezi výjimky, které jsou ponechány s těmito názvy z historických důvodů, a jejich homology budou pojmenovávány po nich.

U rostlin a virů je značení značně odlišné, u rostlin například chybí pomlčka za miR a pre-miRNA jsou značeny kapitálkami (Ambros, Bartel et al. 2003, Budak, Bulut et al. 2015).

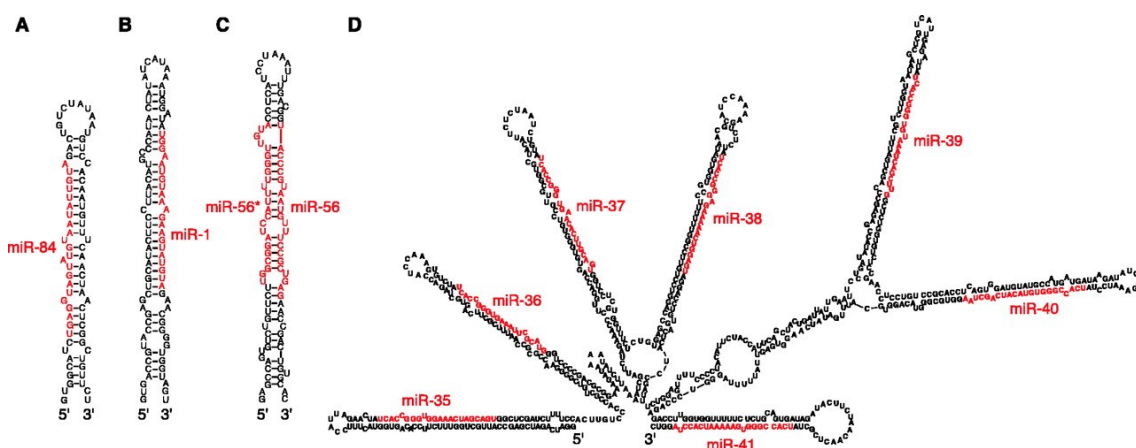
Vzhledem k rozšiřujícím se znalostem o miRNA a jejich zvyšujícímu se počtu někteří volají po revizi a zpřehlednění dalšího označování miRNA (Budak, Bulut et al. 2015, Desvignes, Batzel et al. 2015).

Pro orientaci v miRNA názvech, vlastnostech a hledání jejich cílů je mnoho databází jako například [www.miRBase.org](http://www.miRBase.org) (Kozomara, Birgaoanu et al. 2018), některé z nich vyjmenovali ve svém článku Budak a kol. (Budak, Bulut et al. 2015).

### II.1.2 Biogeneze miRNA

miRNA se v genomu vyskytují většinou v intronech protein kódujících genů, ale i v oblastech, které nekódují RNA (Rodriguez, Griffiths-Jones et al. 2004). Geny pro některé miRNA jsou v klastrech (Altuvia, Landgraf et al. 2005) a proto jsou některé miRNA přepisovány polycistronicky (Lee, Jeon et al. 2002).

Prvotní prekuzory pri-miRNA (*primary precursor for miRNA*) jsou transkribovány RNA polymerázou II (Lee, Kim et al. 2004), ale mohou být i produktem RNA polymerázy III (Borchert, Lanier et al. 2006). pri-miRNA mají na 5' konci 7-metyl guanozinovou ( $m^7G$  – 7-metyl guanozin) čepičku a poly-A řetězec na 3' konci (Lee, Kim et al. 2004). Transkript pri-miRNA může být až několik set bazí dlouhý a může obsahovat více miRNA naráz (Lee, Jeon et al. 2002) viz obrázek 2 A.



Obrázek 2: **Příklady sekundárních struktur pri-miRNA**

Příklady sekundárních struktur pri-miRNA z *Caenorhabditis elegans* (Lau, Lim et al. 2001)

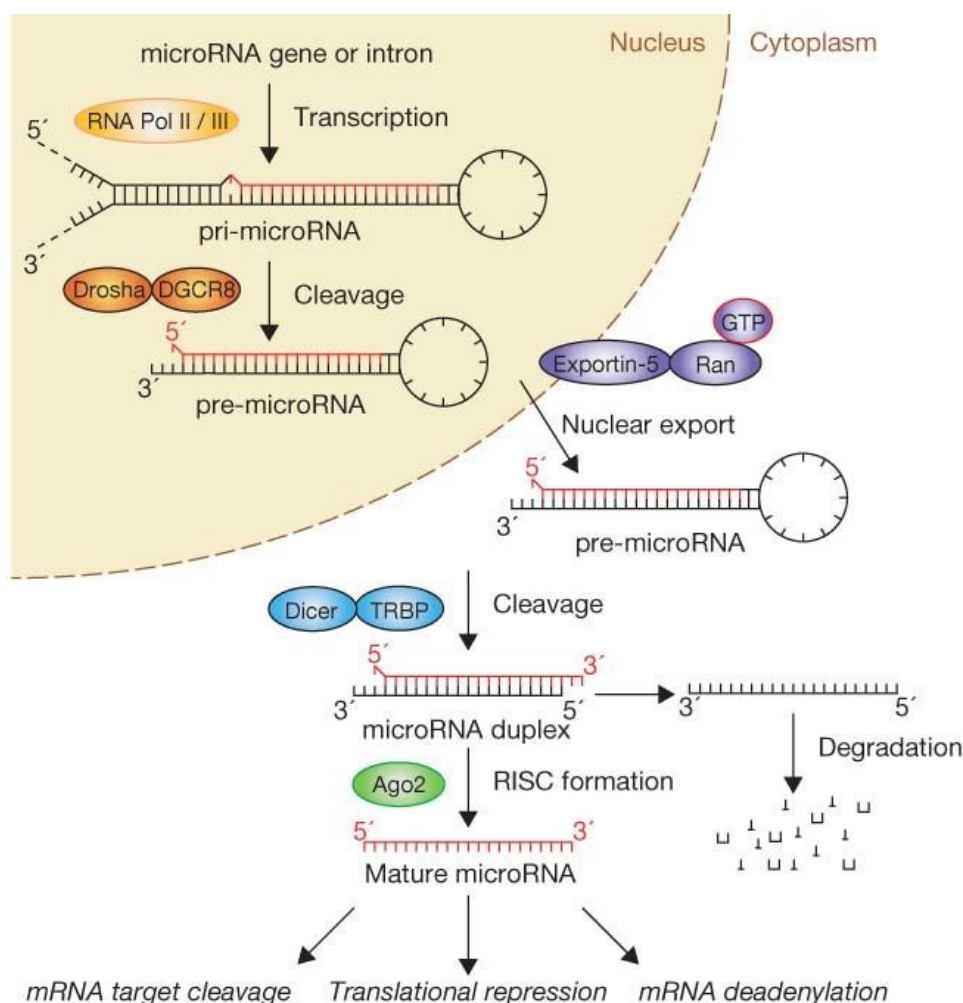
Červeně sekvence samotné miRNA, černě okolní sekvence. A – miR-84, která je podobná *let-7*, B – vysoce konzervovaná miR-1, C – miR-56 a miR-56\*, D – klastr miR-35 – miR-41.

Po translaci je pri-miRNA v jádře štěpena enzymem Drosha na přibližně 70 nt dlouhou pre-miRNA (*precursor for miRNA*) (Wu, Xu et al. 2000, Le, Ahn et al. 2003). Drosha je součástí přibližně 500 kDa velkého multiproteinového komplexu zvaného Microprocessor, který obsahuje enzym Pasha (*partner of Drosha*), což je protein vázající dvouvláknovou RNA (dsRBD – *double-strand RNA binding domain*) (Denli, Tops et al.



2004) a dvě domény RNázy typu III (Filippov, Solovyev et al. 2000). Pasha je u člověka nazýván DGCR8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region 8*) a zprostředkovává interakci mezi pri-miRNA a enzymem Drosha, protože obsahuje dvě dsRBD na C-konci (Yeom, Lee et al. 2006).

pre-miRNA, vzniklá štěpením pri-miRNA, je po navázání na Exportin-5 transportována do cytoplazmy (Yi, Qin et al. 2003). Typická pre-miRNA je tvořena vlásenkovou strukturou (Obrázek 3) se smyčkou na konci (Grishok, Pasquinelli et al. 2001, Hutvágner, McLachlan et al. 2001), která u živočichů obsahuje mnoho smyček, mismatchů, především G:U páry a netvoří pravidelnou dvoušroubovici (Schwarz, Hutvágner et al. 2003).



Obrázek 3: **Biogeneze miRNA** (Winter, Jung et al. 2009)

V jádru je transkript pri-miRNA štěpen komplexem mikroprocesoru na pre-miRNA. pre-miRNA je přes Exportin-5 transportována do cytoplazmy, kde je enzymem Dicer štěpena na miRNA duplex, zralá miRNA po sestavení s RISC navádí na cílovou sekvenci mRNA, kde různými způsoby blokuje translaci, zatímco miRNA\* je degradována.

Červeně miRNA, černě ostatní sekvence včetně miRNA\*

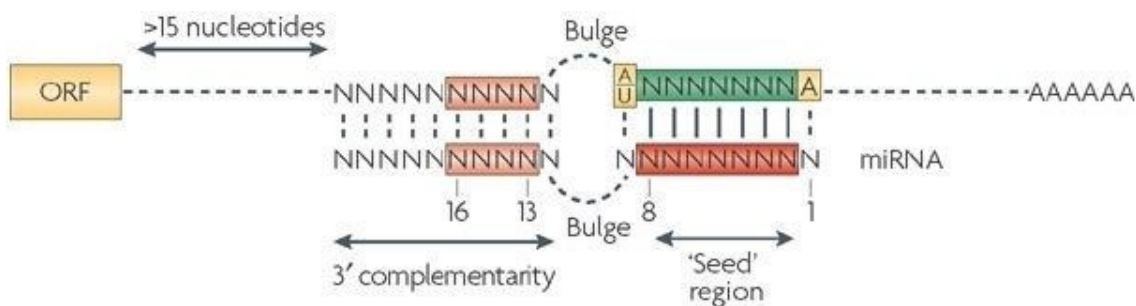
V cytoplazmě je pre-miRNA štěpena enzymem Dicer na cca 22 nt dlouhý dvouvláknový miRNA duplex (Lee, Jeon et al. 2002) obsahující miRNA a miRNA\* (Hutvágner and Zamore 2002). Dicer je ATP-dependentní RNáza s RNA helikázovou doménou, PAZ doménou a dvěma RNáza III doménami (Bernstein, Caudy et al. 2001). Dicer je součástí proteinového komplexu o velikosti přibližně 500 kDa, jeho dalšími součástmi jsou TRBP

(*Trans Activating Response RNA-Binding Protein*) a Ago2 (Gregory, Chendrimada et al. 2005, Chendrimada, Gregory et al. 2005).

Duplex miRNA vytvoří komplex s enzymem RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). RISC je komplex proteinů, který obsahuje Ago2 s endonukleázovou aktivitou (Meister, Landthaler et al. 2004), PIWI (*P-element induced wimpy testis*), PAZ (*PIWI Argonaute Zwiller*) a glutamin-bohatou doménu (Hammond, Boettcher et al. 2001, Meister, Landthaler et al. 2004). Ke své činnosti RISC nepotřebuje ATP (Gregory, Chendrimada et al. 2005). miRNA asociuje s enzymem RISC a podle asymetrické nedokonalosti párování dojde k výběru miRNA (*guide strand*), která navede RISC na mRNA a miRNA\* (*passenger strand*) je zničena. Pokud jsou konce symetrické, oba typy miRNA-5p i miRNA-3p jsou použity stejně často (Schwarz, Hutvagner et al. 2003).

### II.1.3 Funkce microRNA

miRNA inhibují translaci tím, že v komplexu s RISC nasedají na 3' UTR (*untranslated region* – netranslatovaná oblast), popřípadě 5' UTR nebo kódující oblast příslušné mRNA (Obrázek 4) (Wightman, Ha et al. 1993, Grishok, Pasquinelli et al. 2001, Humphreys, Westman et al. 2005, Lytle, Yario et al. 2007, Tay, Zhang et al. 2008, Schnall-Levin, Zhao et al. 2010). Díky nasedání na různé části mRNA a účinnosti i při neúplné komplementaritě může miRNA regulovat více cílů a jedna mRNA může být regulována více miRNA (Tay, Zhang et al. 2008). Na základě míry komplementarity RISC buď mRNA štěpí (při vysoké komplementaritě), nebo jen blokuje translaci (při nedokonalé komplementaritě), v tomto případě mRNA zůstává kompaktní (Hutvagner and Zamore 2002, Zeng, Yi et al. 2003). Nejdůležitější je souvislé a přesné párování v takzvané *seed* sekvenci, která je mezi druhým a osmým nukleotidem miRNA (Doench and Sharp 2004, Lewis, Burge et al. 2005), ale závisí i na dalších sekvencích a jejich kombinaci (Grimson, Farh et al. 2007).

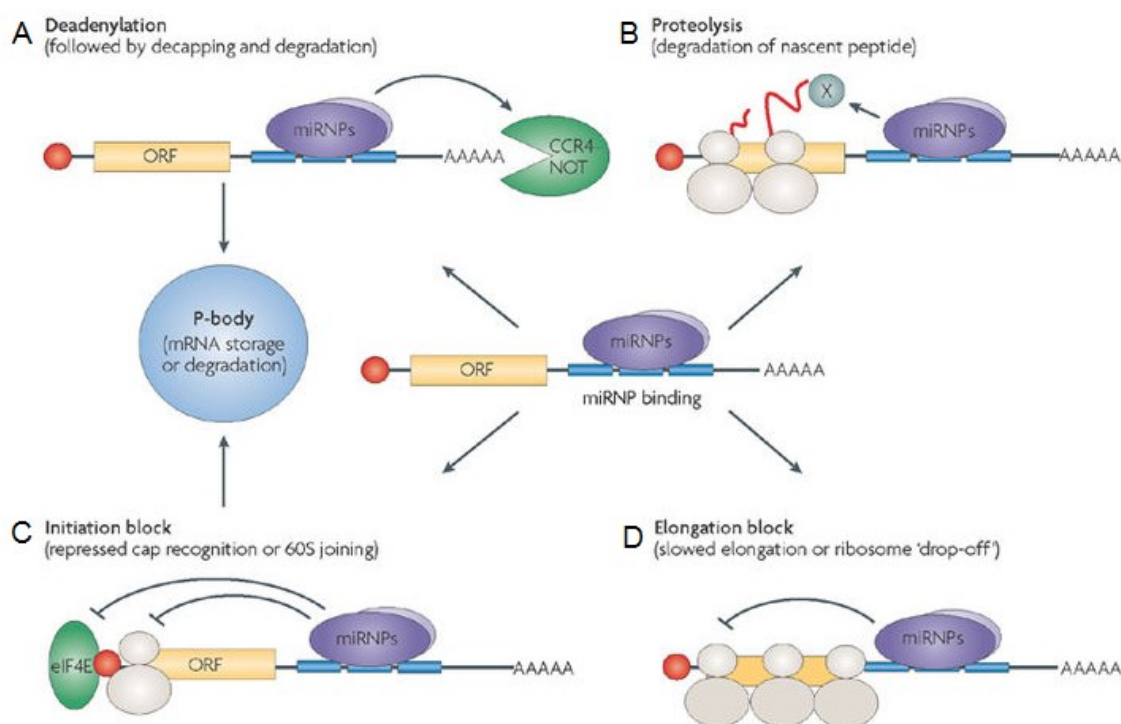


Obrázek 4: **Způsob párování miRNA k mRNA** (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008)

Od 5' konce se miRNA váže seed sekvencí (syťá červená na miRNA, zelená na mRNA) na 3' UTR mRNA, následuje sekvence bez komplementarity (díky které nedochází k endonukleolytickému štěpení duplexu miRNA:mRNA). Po místě bez párování je opět relativně komplementární úsek (oranžová) stabilizující celý duplex, kde je chybné párování tolerováno.

K represi může dojít čtyřmi způsoby: deadenylací, při iniciaci translace, přerušením v průběhu translace a přerušením elongace:

- 1) Deadenylace mRNA (Obrázek 5 A) je vedena komplexem miRNA-RISC a vede k odstranění čepičky a degradaci mRNA v P-bodies (*Processing bodies*, tělíska degradující RNA) (Bagga, Bracht et al. 2005).
- 2) Cytoplazmatická proteolýza nascentního proteinu neznámým enzymem (Obrázek 5 B) je dalším ze způsobů inhibice translace (Nottrott, Simard et al. 2006).
- 3) Při iniciačním kroku translace tím, že miRNA interferuje s rozpoznáním m<sup>7</sup>G čepičky iniciačními faktory (Obrázek 5 C). miRNA:mRNA duplex se nachází v P-bodies (Pillai, Bhattacharyya et al. 2005).
- 4) K postiniciační represi dochází již po sestavení mRNA s ribozomy, které ale disociují dříve, než je dokončen nascentní řetězec polypeptidu (Obrázek 5 D) (Petersen, Bordeleau et al. 2006).



Obrázek 5: **Různé způsoby funkce miRNA** (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008)

miRNA blokuje translaci mRNA do proteinu několika různými způsoby: A – Deadenylací mRNA, B – proteolýzou nascentního polypeptidu, C – blokováním rozpoznání  $m^7G$  čepičky při iniciaci translace nebo D – blokováním elongace nascentního polypeptidu.

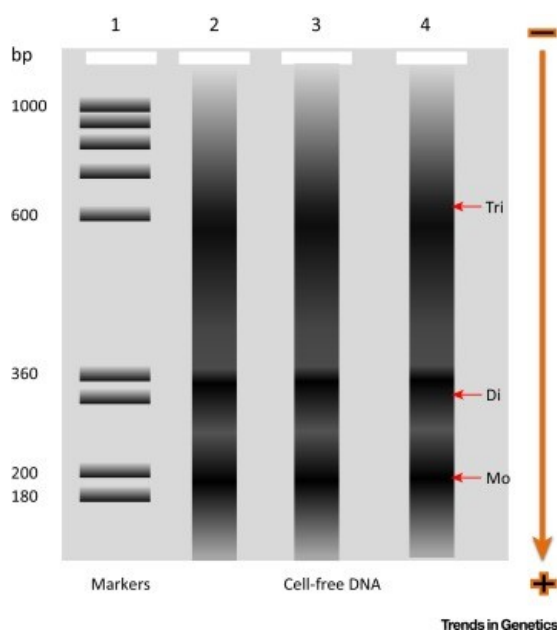
## II.2 Volná DNA

Volná dna (cfDNA, *cell free DNA*) byla objevena v krvi již v roce 1948 Mandelem (Mandel 1948). Dále se tímto tématem nikdo nezabýval, až o desetiletí později byla prokázána u pacientů se systémovým lupus erythematoses<sup>1</sup> (Tan, Schur et al. 1966)

<sup>1</sup> Systémový lupus erythematoses je autoimunitní onemocnění, při kterém vznikají imunitní komplexy po polyklonální aktivaci B-lymfocytů. Vznikají protilátky proti mnoha autoantigenům včetně DNA a histonů.

Fritzler, M. J. and E. K. Chan (2004). Antibodies to nonhistone antigens in systemic lupus erythematosus. *Systemic Lupus Erythematosus (Fourth Edition)*, Elsevier: 349-376.

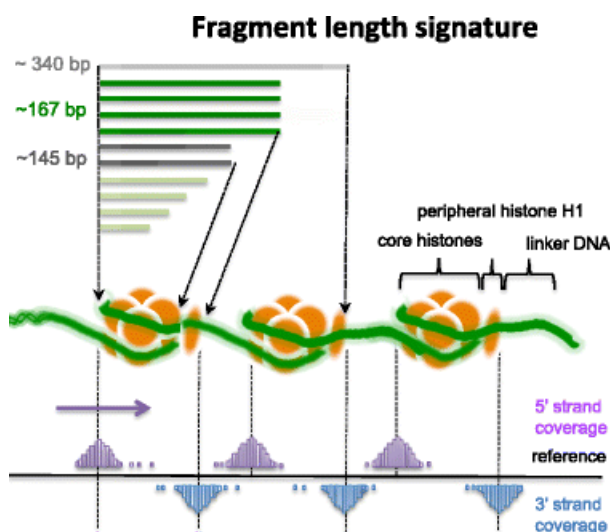
a pacientů s dalšími onemocněními (Anker, Mulcahy et al. 1999). V plazmě zdravých lidí byl obsah cfDNA dlouho diskutován a vyvracen, až s moderními metodami s dostatečně silnou detekční schopností byla cfDNA potvrzena jako běžná složka plazmy i u zdravých lidí (Steinman 1975).



Obrázek 6: **Velikost cfDNA** (Jiang and Lo 2016)

V prvním sloupci je DNA ladder, ve sloupcích 2-4 je cfDNA. Mo – velikost jednoho nukleozomu, Di – velikost dvou nukleozomů, Tri – velikost tří nukleozomů.

cfDNA se nejčastěji vyskytuje ve fragmentech o velikosti přibližně 180 bp a jejích násobcích (Obrázek 6) (Giacona, Ruben et al. 1998, Jahr, Hentze et al. 2001), což se nápadně podobá vzoru DNA z apoptotických buněk (Stroun, Anker et al. 1987). Fragmentace cfDNA není náhodná, ale kopíruje rozložení nukleozomů (Obrázek 7) (Chandrananda, Thorne et al. 2015). Na základě toho se předpokládá, že se většina cfDNA v cirkulaci vyskytuje v podobě nukleoproteinu anebo vázána na povrch buněk (Laktionov, Tamkovich et al. 2004).



Obrázek 7: **Rozložení velikosti fragmentů cfDNA** (Chandrananda, Thorne et al. 2015)

Rozložení velikosti fragmentů cfDNA odpovídá rozložení DNA na nukleosomech. DNA je nejčastěji štěpena až za histonem H1, často dochází ke štěpení mezi histonovým jádrem a H1.

Množství cfDNA je zvýšeno při poškození tkání, například u autoimunitních a maligních onemocnění, při úrazech (Lo, Rainer et al. 2000) a nekróze (infarktu myokardu) (Antonatos, Patsilinos et al. 2006). Množství cfDNA může být zvýšeno i při fyziologických stavech jako je zvýšená námaha a těhotenství. Při zvýšené námaze se do cirkulace vyplaví více DNA, ale v klidovém režimu opět klesá k původní hladině (Atamaniuk, Vidotto et al. 2004). V těhotenství je kvantum cfDNA zvýšeno o fetální DNA, ta je do maternální cirkulace uvolňována z trofoblastu (Alberry, Maddocks et al. 2007) v průměru  $2,24 \times 10^4$  kopií/min (s velkými interindividuálními rozdíly) a je po porodu velmi rychle odbourána. Její poločas rozpadu je odhadován na 16,3 min (4-30 min) (Lo, Zhang et al. 1999).

Koncentrace cfDNA u zdravých se neliší mezi pohlavími, věkovými skupinami ani rasami (Wu, Zhang et al. 2002, Zhong, Hahn et al. 2007). U téměř všech malignit je její koncentrace zvýšena (Wu, Zhang et al. 2002).

Prokaryotická i eukaryotická DNA z média/cirkulace je aktivně přijímána do buněk (Adams, Diaz et al. 1997, Gahan 2006), což naznačuje možnost jejího využití jako posla se signální funkcí mezi buňkami a tkáněmi (Adams, Diaz et al. 1997). Cirkulující DNA

může přecházet přes hematoencefalickou bariéru (Gahan 2006). Savčí DNA v cirkulaci působí imunosupresivně (Pisetsky 2000, Zinkova, Brynychova et al. 2017) a u zdravých jedinců proti ní nevznikají protilátky. Naopak proti prokaryotické DNA protilátky vznikají a hrají svoji důležitou roli v imunitní reakci (Pisetsky 2000).

### II.2.1 Původ cfDNA

Přesto, že existence volné cirkulující DNA byla popsána už v roce 1948 (Mandel 1948), přesný mechanismus jejího uvolňování je stále nejasný. Vzhledem k velikosti fragmentů cfDNA se jako hlavní původce jeví apoptotické buňky (Giacona, Ruben et al. 1998, Jahr, Hentze et al. 2001). Zdrojem delších fragmentů jsou nekrotické buňky (Jahr, Hentze et al. 2001).

DNA je buňkami aktivně uvolňována do cirkulace do dosažení určité koncentrace mimo buňky, dále už aktivní sekrece nepokračuje. Jde především o nově syntetizovanou DNA (Rogers, Boldt et al. 1972, Stroun and Anker 1972, Abolhassani, Tillotson et al. 1994, Stroun, Lyautey et al. 2001 A). Uvolňovaná DNA tvoří obdobný vzor na elektroforéze jako DNA z apoptotických buněk (Abolhassani, Tillotson et al. 1994, Stroun, Lyautey et al. 2001 B) a je ve dvouvláknové formě s 5' přesahujícími konci (Suzuki, Kamataki et al. 2008).

Většina nenádorové cfDNA v cirkulaci pochází z hematopoetických buněk (Lui, Chik et al. 2002). Dalším zdrojem jsou apoptotické buňky, které DNA uvolňují do cirkulace (Choi, Reich et al. 2004). Další je NETóza (*Neutrophil Extracellular Traps*) proces, při kterém neutrofily aktivně uvolňují DNA a další látky do cirkulace k vytvoření sítí, které zachytí bakterie (Korabecna and Tesar 2017).

### II.2.2 cfDNA a malignity

Fragmenty nádorové DNA v cirkulaci pochází z nekrotických neoplastických buněk, které jsou fagocytovány makrofágy. Makrofágy také fagocytují apoptotické buňky a tím se do cirkulace dostává i nenádorová cfDNA (Brouckaert, Kalai et al. 2004, Choi, Reich et al. 2005).



cfDNA je nejčastěji ve fragmentech o velikosti přibližně 180 bp a jejích násobcích (Giacona, Ruben et al. 1998, Jahr, Hentze et al. 2001), ale vyskytuje se i v mnohem delších fragmentech, což odpovídá původu z apoptotických i nekrotických buněk pacientů s rakovinou (Abolhassani, Tillotson et al. 1994, Jahr, Hentze et al. 2001).

Fragmenty cfDNA zdravých lidí se liší od cfDNA lidí s maligním onemocněním, kteří mají fragmenty delší (Giacona, Ruben et al. 1998, Wang, Huang et al. 2003).

Stupeň invazivity nádoru koreluje s množstvím fragmentů cfDNA v krvi. Fragmenty nádorové DNA v krvi pochází z nekrotických buněk nádoru pohlcených makrofágy. Čím rychleji nádor roste a čím je vyšší míra invaze, dochází k horšímu krevnímu zásobení a tím více je nádor v hypoxii a více dochází k nekróze. Čím vyšší je míra nekrózy v tumoru, tím více i zdravých buněk umírá nekrózou a tím pádem je uvolňováno i více nenádorové DNA do cirkulace (Diehl, Li et al. 2005).

Množství cfDNA u většiny onkologických pacientů po léčbě klesá, pokud ne, je to špatný prognostický znak naznačující, že tumor na léčbu neodpovídá (Leon, Shapiro et al. 1977, Jung, Fleischhacker et al. 2010).

### II.2.3 cfDNA v moči

DNA se dá získat ze dvou frakcí moči, které oddělíme centrifugací 1) ze supernatantu – skutečná cfDNA a 2) ze sedimentu – čili buněk odloučených ze sliznice močového traktu. Nemálo studií pracuje i s celou močí, pracují tedy s volnou i buněčnou DNA. V mnoha článcích se původ močové DNA dá zjistit až pečlivým čtením v sekci „*Materials and methods*“, jiní autoři si zakládají na pečlivém rozlišení již v abstraktu.

cfDNA v supernatantu moči pochází ze dvou zdrojů, prvním jsou buňky močového traktu a druhým je krev. Z buněk uroteliálního traktu má volná DNA větší fragmenty, někdy i přes 1 kb (s největším zastoupením mezi 200-300 bp), delší než jsou běžné fragmenty v krvi a plazmě (Ward and Bryan 2017). Z krve se cfDNA do moči dostává filtrací ledvinovými glomeruly, přes které projdou fragmenty v délce mezi 100 a 250 bp (Su, Wang et al. 2004, Bryzgunova and Laktionov 2015). Zatímco v krvi je cfDNA chráněna v nukleosomech, exosomech a apoptotických těliscích (Bryzgunova and

Laktionov 2014), do moči tyto velké struktury neprojdou (Tencer, Frick et al. 1998) a tím pádem má cfDNA v moči kratší poločas rozpadu (Yao, Mei et al. 2016).

### II.3 Rakovina močového měchýře

Rakovina močového měchýře je 11. nejčastěji diagnostikované maligní onemocnění ve světě a sedmé, pokud se zaměříme pouze muže (Ferlay, Soerjomataram et al. 2014). V České republice jde o šesté nejčastější maligní onemocnění a tvoří 4 % nově diagnostikovaných malignit (Mužík J. 2007-2011). V roce 2015 byla incidence 20,47 a mortalita 8,41 na 100 000 obyvatel. Incidence má od roku 2014 klesající tendenci, ale mortalita zůstává na stejné úrovni. Rakovina močového měchýře postihuje třikrát častěji muže než ženy (Dušek, Mužík et al. 2015).

Přibližně 70 % nádorů tvoří neinvazivní nádory ve stadiu Ta, které mají velmi dobrou prognózu i přes to, že často recidivují (50-70 % případů). Jen zřídka, zhruba u 15 % pacientů dochází k progresi k invazivním tumorům. Zbytek tvoří nádory, které infiltrují subepiteliální pojivovou tkáň a svaly (stadia T1-T4), pacienti s těmito tumory mají méně než 50 % pravděpodobnost pětiletého přežití (Knowles 2006, Weisbach, Dahlem et al. 2013, Babjuk, Böhle et al. 2017).

Kouření cigaret je výrazným rizikovým faktorem pro vznik rakoviny močového měchýře, jako předpokládaný spouštěč se vyskytuje zhruba u 50 % případů, mezi další faktory zvyšující výskyt rakoviny močového měchýře patří aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky, ionizační záření, ale i schistosomóza<sup>2</sup> (Burger, Catto et al. 2013).

Nejčastějším příznakem je bezbolestná makroskopická hematurie, která se vyskytuje u 85 % případů při diagnóze. Dalším příznakem je nesymptomatická mikroskopická hematurie, která se projeví u 10 % pacientů, zbytek má potíže, které se snadno zamění

---

<sup>2</sup>Schistosomóza je tropické parazitární onemocnění lidí i zvířat způsobené motolicemi rodu *Schistosoma*, které se šíří kontaminovanou vodou.

Gryseels, B., et al. (2006). "Human schistosomiasis." *The Lancet* **368**(9541): 1106-1118.

s příznaky jiných urologických onemocnění jako je časté a urgentní dráždění na močení a dysurie (pálivá až řezavá bolest při močení) (Dobbs, Hugar et al. 2014).

### II.3.1 Diagnostika a klasifikace rakoviny močového měchýře

Diagnostickými metodami jsou cystoskopie, ultrazvuk, počítačová tomografie (CT), vyšetření moči, popřípadě výplachu močového měchýře a odloučených nádorových buněk. Cystoskopie je zlatý standard, protože je to diagnostická i terapeutická metoda (vizualizace patologické léze, provedení transuretrální resekce (zárok prováděný endoskopicky skrz močovou trubici, jsou při něm vyříznuta podezřelá ložiska) a z toho vyplývající odběr materiálu k morfologické diagnostice). Léčebnou metodou je transuretrální resekce močového měchýře nebo radikální cystektomie (odstranění močového měchýře, pánevních lymfatických uzlin a operace zajišťující odvod moči z těla po odstranění močového měchýře) (Babjuk, Böhle et al. 2017).

Klasifikace rakoviny močového měchýře spočívá ve stagingu (TNM klasifikace, kterou provádí urolog) a gradingu (patologického stanovení stupně malignity).

**TNM klasifikace** (Obrázek 8) (Sobin, Gospodarowicz et al. 2011):

T – označuje primární nádor a jeho stádium, N – označuje počet zasažených lymfatických uzlin, M – označuje, jestli má nádor vzdálené metastázy

TX – tumor nemůže být hodnocen

T0 – bez důkazu primárního tumoru

Ta – neinvazivní papilární karcinom

CIS – karcinom *in situ* – plochý tumor

T1 – tumor invaduje subepiteliální pojivovou tkáň

T2 – tumor invaduje svaly

T3 – tumor invaduje perivezikální tkáň (tkáň okolo močového měchýře)

T4 – tumor invaduje jedno z následujících: prostatu, dělohu, vagínu, pánevní stěnu nebo břišní stěnu

NX – lymfatické uzliny nemohou být hodnoceny

N0 – bez metastáz v lymfatických uzlinách

N1 – metastáza v jedné lymfatické uzlině v pánevní oblasti

N2 – metastázy ve více lymfatických uzlinách v pánevní oblasti

N3 – metastázy v lymfatických uzlinách v kyčelní oblasti

MX – vzdálené metastázy nemohou být hodnoceny

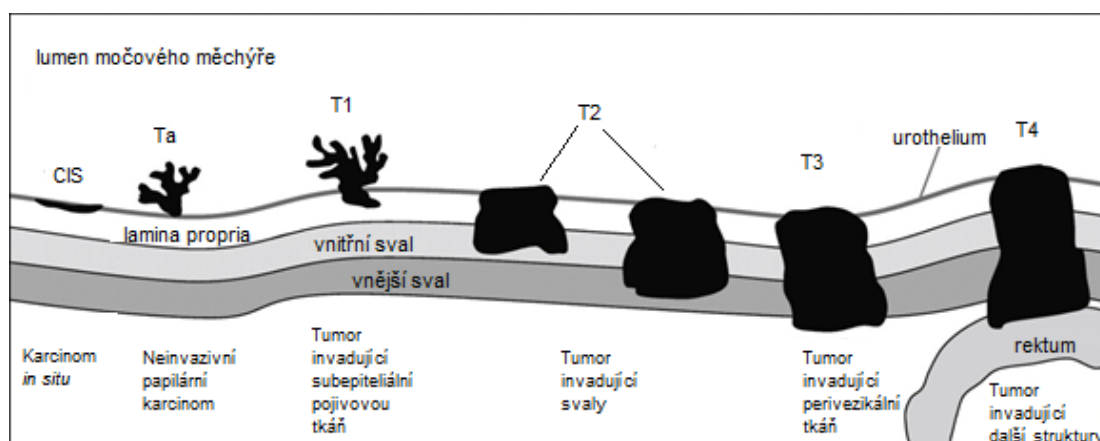
M0 – bez důkazu vzdálených metastáz

M1 – vzdálená metastáza

2004/2016 **klasifikace světové zdravotnické organizace** podle stupně malignity  
(Eble 2004):

LG – *low grade* – nízký stupeň buněčné diferenciaci

HG – *high grade* – vysoký stupeň buněčné diferenciaci



Obrázek 8: **Stadia rakoviny močového měchýře** podle TNM klasifikace (upraveno podle (Knowles 2006))

Pro účely léčby se uroteliální karcinom dělí na dvě velké skupiny:

1) Mezi NMIBC (*non-muscle invasive bladder cancer* – do svalů neinvadující rakovina močového měchýře) patří stadia Ta, T1 a CIS (*Carcinoma in situ*). Ta a T1 jsou papilární nádory na sliznici nebo zasahující do lamina propria (vrstva sliznice tvořená vazivem), jako CIS jsou označovány ploché nádory HG (*high grade*) na sliznici. Standardní léčba je transuretrální resekce lézí a intravezikální instilace (podání tekutiny/roztoku do

močového měchýře) mytomycinu C<sup>3</sup> nebo instilace roztoku *Bacillus Calmette-Guérin*<sup>4</sup> (Babjuk, Böhle et al. 2017).

2) MIBC (muscle invasive bladder cancer – do svalů invadující rakovina močového měchýře). Všechny MIBC jsou považovány za HG nádory. Radikální cystektomie spolu s neoadjuvantní chemoterapií (chemoterapie před chirurgickým zákrokem, za účelem zmenšení nádoru a možnosti provedení méně rozsáhlé operace) je standartní léčba (Witjes, Compérat et al. 2014).

### II.3.2 miRNA v moči jako diagnostický marker

Rakovina močového měchýře je charakteristická dlouhou dobou přežití a z ekonomického hlediska patří mezi nejnákladnější z rakovin na léčbu od diagnózy do úmrtí pacienta. To je způsobeno především potřebou doživotního sledování, značné náklady jsou vynakládány na neustálou opětovnou diagnostiku a následnou léčbu (Botteman, Pashos et al. 2003). I proto by nalezení vhodného markeru mohlo vést nejen k lepší péči o pacienta, ale i ke snížení těchto nákladů.

Přes to, že se obsahem miRNA v moči zabývá mnoho souborných článků, každé má kritéria, při kterých některé výzkumy vypadnou. Proto jsem provedla vlastní rešerši, kdy jsem do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zadala hesla: „miRNA“, „bladder cancer“, „urine“. K 24.4.2019 bylo nalezeno 99 článků, vynechala jsem všechny nepůvodní práce (review, meta analýzy) a práce, které se do výběru dostaly, přes to, že se nezabývaly jedním z kýžených témat a zbylo 41 článků. Vzhledem k vysokému počtu prací jsem se rozhodla pro přehledné shrnutí ve formě tabulky (Tabulka 1). Údaje v tabulce jsou řazeny podle toho, v jaké části moči jsou miRNA stanovovány.

---

<sup>3</sup> Mitomycin C je alkylační činidlo s antibiotickou a protinádorovou aktivitou, která blokuje syntézu DNA Verweij, J. and H. M. Pinedo (1990). "Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations." *Anticancer Drugs* **1**(1): 5-13.

<sup>4</sup> *Bacillus Calmette-Guérin* se používá také jako vakcína proti tuberkulóze (*Mycobacterium tuberculosis*) se subkutánním (podkožním) podáním.

Roy, A., et al. (2014). "Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis." *Bmj* **349**: g4643.

Tabulka 1: Rešerše článků na stanovení miRNA v moči

Vyšetřovaný materiál	Normali- zace	Metoda stanovení miRNA	miRNA		Citace
			Se sníženou expresí	Se zvýšenou expresí	
Celá moč	RNU48, miR-103	array, assay	let-7c miR-148a miR-204	miR-135a miR-135b miR-345	(Hofbauer, de Martino et al. 2018)
Celá moč	5S rRNA	assay		miR-21-5p miR-141-3p miR-205-5p	(Ghorbanmehr, Gharbi et al. 2018)
Celá moč	miR-152	Base stacking hybridizace a exponenciální izotermální amplifikace	miR-126:miR-152 miR-182:miR-152  Poměry jsou vyšší u pacientů		(Cheng, Xu et al. 2017)
Celá moč	miR-21-5p	assay		miR-146a-5p	(Sasaki, Yoshiike et al. 2016)
Celá moč	Koncentra- ce a osmolalita moči	assay		miR-16 miR-21 miR-34a miR-200c miR-205 miR-221	(Sapre, Macintyre et al. 2016)
Celá moč	RNU6	microarray, assay		miR-618 miR-1255b-5p	(Tölle, Jung et al. 2013)
Celá moč	RNU6B	assay	miR-125b	miR-126	(Snowdon, Boag et al. 2013)
Celá moč	miR-16	assay	miR-143	miR-222 miR-452	(Puerta-Gil, García-Baquero et al. 2012)
Celá moč	RNU6B	assay		miR-96 miR-183	(Yamada, Enokida et al. 2011)
Celá moč	miR-152	assay		miR-126 miR-182	(Hanke, Hoefig et al. 2010)

Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ 1: Rešerše článků na stanovení miRNA v moči

Vyšetřovaný materiál	Normalizace	Metoda stanovení miRNA	Vybrané miRNA		Citace
			Down regulované	Up regulované	
Celá moč	Relative quantity was acquired based on the common positive	assay		miR-182	(Wei, Bing et al. 2015)
Supernatant	Poměr	microarray, assay	miR-4511	miR-6124	(Piao, Jeong et al. 2018)
Supernatant	DESeq2 package	small RNAseq		miR-17-5p miR-20a-5p miR-93-5p miR-106b-5p miR-3934-5p	(Allione, Pardini et al. 2018)
Supernatant	Absolutní koncentrace	microarray, assay		miR-31-5p miR-93-5p miR-191-5p	(Juráček, Staník et al. 2018 B)
Supernatant	miR-28-3p a miR-361-3p	small RNAseq, assay	miR-30a-5p let-7c-5p	miR-7-1-5p miR-25-3p miR-183-5p miR-185-5p miR-205-5p miR-224-5p miR-486-5p	(Pardini, Cordero et al. 2018)
Supernatant	Absolutní koncentrace	microarray, assay		miR-31-5p miR-93-5p miR-191-5p	(Juracek, Peltanova et al. 2018 A)
Supernatant	RNU6	assay	miR-186		(He, Ping et al. 2017)

Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ 2: Rešerše článků na stanovení miRNA v moči

Vyšetřovaný materiál	Normalizace	Metoda stanovení miRNA	Vybrané miRNA		Citace
			Down regulované	Up regulované	
Supernatant	Detekce miRNA a aktivity telomerázy	miRNA-induced rolling circle amplification, graphene oxide (GO) and nicking enzyme-assisted signal amplification	miR-21		(Duan, Zhang et al. 2017)
Supernatant	let-7b-5p a miR-532-3p	Hluboké sekvenování, assay	miR-200a-3p miR-423-5p	miR-7-5p miR-22-3p miR-29a-3p miR-126-5p miR-375	(Du, Jiang et al. 2017)
Supernatant	miR-191, miR-28-3p a miR-200b	array, assay	miR-30b miR-99a miR-125b miR-204 miR-532-3p		(Pospisilova, Pazourkova et al. 2016)
Supernatant	---	array, assay		miR-26a miR-93 miR-191 miR-940	(De Long, Sullivan et al. 2015)
Supernatant	RNU6 a RNU48	assay bez izolace		miR-155	(Zhang, Zhang et al. 2016)
Supernatant	RNU6 a RNU48	assay	miR-214		(Wang, Zhang et al. 2015)
Supernatant	miR-222	assay	miR-205		(Michailidi, Hayashi et al. 2015)
Supernatant	RNU6	assay		miR-106b	(Zhou, Zhang et al. 2014)
Supernatant	RNU6B	microarray, assay	miR-99a miR-125b		(Zhang, Lau et al. 2014)



Tabulka 1 – POKRAČOVÁNÍ 3: *Rešerše článků na stanovení miRNA v moči*

Vyšetřovaný materiál	Normali- zace	Metoda stanovení miRNA	Vybrané miRNA		Citace
			Down regulované	Up regulované	
Supernatant	RNU6	assay		miR-214	(Kim, Kang et al. 2013)
Supernatant	RNU6	assay	miR-145 miR-200a		(Yun, Jeong et al. 2012)
Supernatant	RNU48	assay	miR-192	miR-155	(Wang, Chan et al. 2012)
Sediment	RNU6	assay	miR-141-3p	miR-17-5p miR-19a-3p miR-106a-5p miR-146a-5p miR-185-5p	(Eissa, Safwat et al. 2019) (Mearini, Poli et al. 2017)
Sediment	miR-103-3p a miR-30c-5p	assay	miR-140-5p	miR-92a-3p	(Ingelmo-Torres, Lozano et al. 2017)
Sediment	MammU6	array, assay	miR-1305	miR-93 miR-96 miR-140-5p miR-199a-3p miR-224 miR-652 miR-766	(Urquidi, Netherton et al. 2016)
Sediment	RNU6	assay		miR-96 miR-210	(Eissa, Matboli et al. 2015 B)
Sediment	RNU6	array		miR-10b miR-29c miR-210	(Eissa, Matboli et al. 2015 C)
Sediment	RNU6	assay		miR-96	(Eissa, Habib et al. 2015 A)
Sediment	miR-103 a miR-30c	array, assay	miR-125b miR-140-5p miR-142-3p miR-204	miR-18a* miR-25 miR-92a miR-187	(Mengual, Lozano et al. 2013)
Sediment	RNU48	assay	miR-155 miR-192 miR-205		(Wang, Chan et al. 2012)

Tabulka 1– POKRAČOVÁNÍ 4: Rešerše článků na stanovení miRNA v moči

Vyšetřovaný materiál	Normali- zace	Metoda stanovení miRNA	Vybrané miRNA		Citace
			Down regulované	Up regulované	
Sediment	RNU48	assay	miR-15b miR-1224-3p	miR-135b	(Miah, Dudziec et al. 2012)
Extracellular vesicles/ Exozomy	--	assay		miR-21 miR-93 miR-200c miR-940	(De Long, Sullivan et al. 2015)
Extracellular vesicles	Globální průměr	microarray	let-7f-2-3p miR-520c-3p miR-4783-5p	miR-16-1-3p miR-23b-3p miR-28-5p miR-92a-2-5p miR-142-3p miR-195-3p miR-196b-5p miR-299-3p miR-492 miR-513b-5p miR-601 miR-619-5p miR-1285-3p miR-3155a miR-3162-5p miR-3678-3p miR-4283 miR-4295 miR-4311 miR-4531 miR-5096	(Yasui, Yanagida et al. 2017)
Extracellular vesicles	RNU1A1 a RNU5G	microarray, assay	miR-375	miR-146a	(Andreu, Oshiro et al. 2017)

Tabulka 1– POKRAČOVÁNÍ 5: Rešerše článků na stanovení miRNA v moči

Vyšetřovaný materiál	Normali- zace	Metoda stanovení miRNA	Vybrané miRNA		Citace
			Down regulované	Up regulované	
Exozomy	Absolutní kvantifi- kace	nanosting assay, droplet digital PCR		miR-21 miR-29b-3p miR-200c-3p miR-205 miR-720/3007a miR-4454	(Armstrong, Green et al. 2015)
<b>Moč psů:</b> sediment získaný po rozmražení	RNU6	assay	miR-16 miR-103b		(Kent, Zwingenberger et al. 2017)

I když většina těchto článků závěrem uvádí, že jejich postup by byl vhodný jako neinvazivní diagnostický marker, žádný test se v České Republice dodnes rutinně nepoužívá.

### II.3.3 cfDNA v moči jako diagnostický marker

V dnešní době je velká poptávka po neinvazivních diagnostických metodách, které nahrazují nepříjemné invazivní výkony jako je biopsie či cystoskopie, které s sebou nesou i určitá zdravotní rizika. Bez těch invazivních se ale stále neobejdeme. Cystoskopii s biopsií v době diagnózy momentálně žádná neinvazivní metoda nenahradí. Mohla by ale být použitelná u pacientů, kteří jsou pro rakovinu močového měchýře sledováni. Teprve při pozitivních výsledcích neinvazivní metody by byla opakována cystoskopie s případnou další transuretrální resekci.

Jako první volba „neinvazivně“ získaného vzorku je stále plazma, ale u urologických malignit se moč nabízí jako dobře dostupný a opravdu neinvazivně získaný zdroj biologického materiálu. Cytologie moči, i přes velmi vysokou specifitu (94-98 %), nemůže být použita jako samostatný test z toho důvodu, že má velmi nízkou senzitivitu (38-51 %) a to hlavně u neinvazivních tumorů (He, Han et al. 2016). cfDNA v moči má

u urologických malignit lepší výpovědní hodnotu než cfDNA v plazmě (Goessl, Müller et al. 2002).

Několik studií porovnává množství cfDNA v moči pacientů s karcinomem močového měchýře k pacientům s benigními onemocněními. Tento přístup má slibné diagnostické i prognostické výsledky (Chang, Tsui et al. 2007, Casadio, Calistri et al. 2013).

cfDNA lze k diagnostice využít několika způsoby: Brisuda a kol. se zaměřili na koncentraci volné DNA v supernatantu moči a našli signifikantně vyšší koncentraci cfDNA u pacientů s karcinomem močového měchýře v porovnání s kontrolami (Brisuda, Pazourkova et al. 2015). Další se zaměřují na delece (Szarvas, Kovalszky et al. 2007), ztrátu heterozygosity (Ørntoft and Wolf 1998), integritu cfDNA (Jahr, Hentze et al. 2001, Casadio, Calistri et al. 2013), míru metylace (Renard, Joniau et al. 2010, Wang, Yu et al. 2016) nebo mutace v genech či jejich promotorech (Gormally, Vineis et al. 2006, Kinde, Munari et al. 2013).

Jako lepší zdroj informací se zdá být močový supernatant, ve kterém je vyšší zastoupení nádorové DNA než v peletu buněk, což je pravděpodobně způsobeno vyšší mírou nekrózy v prostředí tumoru (Togneri, Ward et al. 2016).

V supernatantu bylo nalezeno 67 % genetických alterací, které byly v nádorové tkáni karcinomu močového měchýře. Zároveň byly nalezeny i alterace, které nebyly ve zkoumaném vzorku tumoru, ale mohly být přítomny v jiné, nezkoumané části tumoru (Szarvas, Kovalszky et al. 2007). Vysoká počáteční koncentrace nádorové DNA v supernatantu moči je známkou progresu nemoci (Ward and Bryan 2017).

cfDNA přechází přes ledvinovou bariéru ve velikostech, které je možné zachytit, proto by bylo možné ji použít i k diagnostickým účelům jiných onemocnění než malignity vylučovací soustavy (Botezatu, Serdyuk et al. 2000).

### III Cíle práce:

Práce si kladla za cíl najít odpovědi na následující otázky:

1. Existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v moči pacientů s nádorem močového měchýře, které jednoznačně odlišují tyto pacienty od osob bez tohoto nádoru?
2. Lze najít rozdíly v expresi močových miRNA dovolující staging pacientů s nádory močového měchýře?
3. Lze hladiny volné DNA v moči využít pro diagnostiku a staging u pacientů s nádory močového měchýře?

Předpoklady pro splnění cílů:

1. V literatuře je mnoho studií zabývajících se expresí miRNA v moči či jejích frakcích u pacientů s rakovinou močového měchýře a porovnávající ji oproti jejich expresi u kontrol, které poukazují na slibnou možnost analýzy vybraných miRNA jako diagnostického nástroje k detekci nádoru močového měchýře.
2. Některé ze studií byly schopny na základě exprese miRNA provést staging pacientů s rakovinou močového měchýře.
3. cfDNA byla v několika dříve publikovaných pracích studována jako marker potenciálně sloužící k odlišení pacientů.

## IV Materiál a metody

### IV.1 Soubory vzorků

Všechny vzorky byly odebírány se souhlasem příslušných etických komisí a s písemným informovaným souhlasem pacientů.

Práce byla financována grantem IGA MZ CR, NT12417 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky.

#### IV.1.1 Soubor vzorků pro studium miRNA v supernatantu moči

Vzorky přirozeně vymočené moči byly sbírány na Urologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol. Vzorky byly odebírány mezi květnem 2012 a červnem 2015. Odebrána byla druhá ranní moč celkem 109 jedinců. Vzorky zahrnuté do studie neměly pozitivní kultivaci ani leukocyturii. Pacienti s podezřením na uroteliální karcinom podstoupili transuretrální resekci močového měchýře nebo radikální cystektomii. Staging a grading rakoviny byl určen urologem a patologem na základě zobrazovacích metod a histologie podle TNM systému Světové zdravotnické organizace z roku 2004.

Studie sestávala ze tří částí, z nichž první dvě měly shodné složení vyšetřovaných jedinců; 46 pacientů s uroteliálním karcinomem a 13 zdravých kontrol (Tabulka 2).

*Tabulka 2: Charakteristika jedinců v první a druhé fázi studie*

	N	Věk (Průměr)	Muži	Ženy	Podskupiny			N
<b>Kontroly</b>	13	29-80 (54,8)	8	5				13
<b>Pacienti</b>	46	41-86 (67,9)	32	14		<b>LG</b>	<b>HG</b>	
					pTa	8	0	8
					pT1	7	7	14
					pT2	0	9	9
					pT3	0	8	8
					pT4	0	7	7

Ve třetí fázi byl vybrán nový soubor jedinců na základě statistického výpočtu pro efektivní velikost porovnávaných skupin, který se skládal z 27 pacientů a 23 kontrol. Kontroly byly rozděleny na zdravé jedince a pacienty s benigním urologickým onemocněním (spermatokéla (nezhoubná cysta v šourku), hyperplazie prostaty, striktura uretry (zúžení močové trubice)), (Tabulka 3).

*Tabulka 3: Charakteristika jedinců ve třetí fázi studie*

	N	Věk (Průměr)	Muži	Ženy	Podskupiny			N
<b>Kontroly</b>	23	50-81 (66,5)	17	6	<b>Zdraví</b>			18
					<b>S benigním onemocněním</b>			5
<b>Pacienti</b>	27	62-76 (68,1)	24	3		<b>LG</b>	<b>HG</b>	
					pTa	15	0	15
					pT1	0	7	7
					pT2	0	5	5

#### IV.1.2 Soubor vzorků pro studium cfDNA v supernatantu moči

Přirozeně vymočené vzorky první a druhé (získané cca 2 h po první) ranní moči byly sbírány na Urologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Urologické klinice Fakultní nemocnice Motol a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Vzorky byly odebírány mezi únorem 2012 a zářím 2014. Vzorky zahrnuté do studie byly kultivačně negativní a bez leukocyturie. Na začátku byla do sterilních nádob odebrána první a druhá ranní moč celkem 27 jedinců; 10 pacientů s uroteliálním karcinomem, 11 zdravých a 6 kontrol s benigním urologickým onemocněním (kámen ledviny nebo močovodu, hydronefróza, hyperplazie prostaty). Následně, když se ukázalo, že druhá ranní moč je vhodnější pro následnou analýzu, byla odebírána pouze druhá ranní moč od dalších 73 jedinců (34 kontrol a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře). Základní charakteristiky osob zahrnutých do studie jsou v tabulce 4.

Tabulka 4: *Charakteristika jedinců ve studii*

	N	Věk (Průměr)	Muži	Ženy	Podskupiny			N
Kontroly	34	8–66 (62,5)	22	12	Zdraví			23
					S benigním onemocněním			11
Pacienti	66	64–69 (67,5)	44	22		LG	HG	
					pTa	21	4	25
					pT1	8	12	20
					pT2		9	9
					pT3		6	6
					pT4		5	5
					CIS		1	1

#### IV.2 Zpracování moči

První a druhá ranní moč byla odebrána do sterilních nádob a její objem byl zaznamenán, z moči byly odebrány vzorky pro potřebné vyšetření (analýza moči, cytologie a kultivace). 50 ml moči bylo odebráno do zkumavky s 535  $\mu$ l 0,5 M EDTA a dalších 50 ml do zkumavky s 1,5 ml RNA Later (Ambion, Life Technologies, NY, USA). Moč s EDTA i RNA Later byla stočena (1100 g, 10 min, 10 °C). Supernatanty byly uskladněny v -20 °C.

#### IV.3 Izolace miRNA z moči

Z 1 ml supernatantu moči s RNA Laterem roztátého na ledu byly izolovány miRNA kitem *Urine microRNA Purification Kit* (NORGEN BIOTEK CORPORATION, Canada) podle standardního protokolu od výrobce. Celý protokol byl prováděn v pokojové teplotě. Dle následujícího postupu:

- 1) K 1 ml supernatantu moči přidat 1,5 ml *Lysis Solution* (připraveného z 1,5 ml *Lysis Solution* a 15  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptetanolu). Mícháním na vortexu po dobu 15 s lyzovat buňky
- 2) Přidat 1,5 ml 96 % etanolu a promíchat 10 s



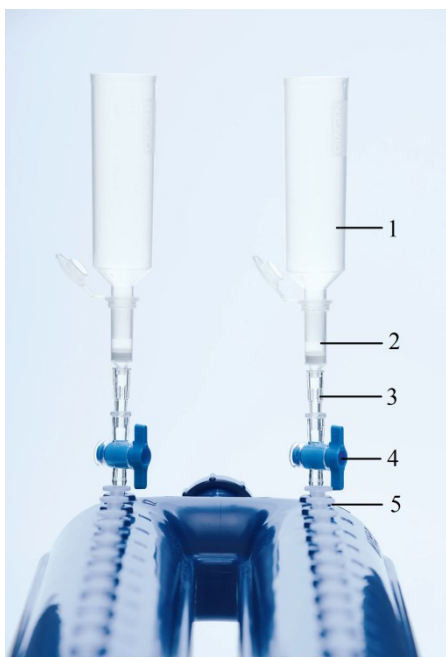
- 3) Nanést na kolonku 650 µl lyzátu a stočit 4300 g, 1 min. Opakovat dokud není zpracován celý lyzát
- 4) Kolonku promýt 400 ml *Wash Solution* stočit 13100 g, 1 min. Opakovat celkem třikrát
- 5) Stočit prázdnou kolonku 13100 g, 2 min
- 6) Nanést na kolonku 50 µl *Elution Solution* a stočit 3000 g, 2 min
- 7) Stočit 13100 g, 2 min

Vyizolované miRNA byly použity ihned pro reverzní transkripci. Zbytek byl zamražen na -70 °C.

#### IV.4 Izolace cfDNA z moči

Z 2 ml supernatantu moči s EDTA roztátého na ledu byla izolována cfDNA kitem *QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit* (QIAGEN, Germany) podle standardního protokolu pro 2 ml moči. Pokud není uvedeno jinak, protokol byl prováděn v pokojové teplotě. Postup je následující:

- 1) Smíchat 250 µl *QIAGEN Proteinase K* s 2 ml supernatantu moči
- 2) Přidat 2 ml *Buffer ACL* (s 1 µg *carrier RNA*)
- 3) Přidat 500 µl *Buffer ATL*. Promíchat vortexem 30 s
- 4) Inkubovat 30 min při 60 °C
- 5) Přidat 4,5 ml *Buffer ACB*. Promíchat vortexem 30 s
- 6) Inkubovat 5 min na ledu
- 7) Sestavit vakuový systém (Obrázek 9) s *VacValve*, *VacConnector*, kolonkou *QIAamp Mini column a tube extender*.



Obrázek 9: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold (obrázek převzat z QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook, Second Edition, January 2011)

1 – tube extender – pro snadnější zpracování většího vstupního objemu vzorku, 2 – QIAamp Mini column – kolonka, 3 – VacConnector – konektor zajišťující sterilitu kolonky, 4 – VacValve – kohoutek pro jemnou regulaci podtlaku mezi jednotlivými otvory, 5 – luer slot – otvor pro VacValve

- 8) Lyzát nanést na *tube extender*. Zapnout vakuovou pumpu a nechat lyzát celý projít skrz kolonku, poté vypnout pumpu a nechat tlak spadnout až na 0 mbar. Opatrně odstranit *tube extender*
- 9) Nanést na kolonku 600 µl *Buffer ACW1*, nechat víčko otevřené a za pomoci vakua nechat celý objem projít stejně jako v kroku 6)
- 10) Nanést na kolonku 750 µl *Buffer ACW2*, nechat víčko otevřené a za pomoci vakua nechat celý objem projít stejně jako v kroku 6)
- 11) Nanést na kolonku 750 µl 96 % etanolu, nechat víčko otevřené a za pomoci vakua nechat celý objem projít stejně jako v kroku 6)
- 12) Stočit 20000 g, 3 min
- 13) Inkubovat 10 min s otevřeným víčkem při 56 °C

14) Nanést na membránu kolonky 50  $\mu$ l *Buffer AVE*

15) Inkubovat 3 min v pokojové teplotě

16) Eluovat cfDNA stočením 20000 g, 1 min

Vyizolovaná cfDNA byla použita ihned do real-time PCR. Zbytek byl zamražen na -20 °C.

## IV.5 Reverzní transkripce miRNA

### IV.5.1 Reverzní transkripce pro array technologii

Reverzní transkripce byla prováděna podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* pro *TaqMan® Array Human MicroRNA Card*. Použity byly primery *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2.1* (vše Applied Biosystems™, CA, USA).

Do reakčního mixu pro jednu reakci reverzní transkripce bylo na ledu smícháno:

<i>Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2.1</i> (10x)	0,8 $\mu$ l
<i>dNTPs s dTTP</i> (100 mM)	0,2 $\mu$ l
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i> (50 U/ $\mu$ l)	1,5 $\mu$ l
10x <i>RT Buffer</i>	0,8 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,9 $\mu$ l
<i>RNase Inhibitor</i> (20 U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l
Voda	0,2 $\mu$ l

Nakonec bylo do mixu pro reverzní transkripci přidáno 3  $\mu$ l vyizolovaných miRNA, směs byla otočením promíchána, krátce stočena a inkubována 5 min na ledu.

Reverzní transkripce proběhla ve Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Germany) při podmínkách uvedených v tabulce 5.

cDNA byla okamžitě zmražena na -20 °C.

Tabulka 5: *Nastavení teplot pro reverzní transkripci s Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2,1*

	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
40x	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 s
1x	85 °C	5 min
1x	4 °C	∞

#### IV.5.2 Reverzní transkripce pro jednotlivé assaye

Reverzní transkripce byla prováděna podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* pro jednotlivé assaye. Použity byly primery *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems™, CA, USA) pro jednotlivé miRNA.

Do reakčního mixu pro jednu reakci reverzní transkripce bylo na ledu smícháno:

<i>dNTPs s dTTP</i> (100 mM)	0,15 µl
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i> (50 U/µl)	1,0 µl
<i>10x RT Buffer</i>	1,5 µl
<i>RNase Inhibitor</i> (20 U/µl)	0,19 µl
Voda	4,16 µl
<i>TaqMan® MicroRNA Assays</i>	3 µl

Poté bylo do mixu pro reverzní transkripci přidáno 5 µl vyizolovaných miRNA, směs byla otočením promíchána, krátce stočena a inkubována 5 min na ledu.

Reverzní transkripce proběhla ve Veriti® Thermal Cyclor (Applied Biosystems™, Germany) při podmínkách uvedených v tabulce 6.

cDNA byla okamžitě zmrazena na -20 °C.

Tabulka 6: *Nastavení teplot pro reverzní transkripci s TaqMan® MicroRNA Assays*

	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
1x	16 °C	30 min
1x	42 °C	30 min
1x	85 °C	5 min
1x	4 °C	∞

#### IV.6 Preamplifikace miRNA

Preamplifikace byla prováděna pouze při použití array karet, podle protokolu *TaqMan® MicroRNA Preamplification s Megaplex™ PreAmp Primers*. Použity byly primery *Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A v2.1* (Applied Biosystems™, CA, USA).

Do reakčního mixu pro jednu reakci preamplifikace bylo na ledu smícháno:

<i>TaqMan® PreAmp Master Mix (2x)</i>	12,5 µl
<i>Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A v2.1</i>	2,5 µl
Voda	7,5 µl

Do hotového mixu bylo přidáno 2,5 µl z reverzní transkripce, směs byla otočením promíchána, krátce stočena a inkubována 5 min na ledu.

Preamplifikace proběhla ve Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Germany) při podmínkách uvedených v tabulce 7.

Preamplifikované miRNA byly bez ředění ihned použity do real-time PCR.

Tabulka 7: *Nastavení teplot pro preamplifikaci*

	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
1x	95 °C	10 min
1x	55 °C	2 min
1x	72 °C	2 min
12x	95 °C	15 s
	60 °C	4 min
1x	99,9 °C	10 min
1x	4 °C	∞

## IV.7 Real-time PCR

### IV.7.1 Relativní kvantifikace miRNA

Pro relativní kvantifikaci miRNA byl použit stroj ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) a real-time PCR.

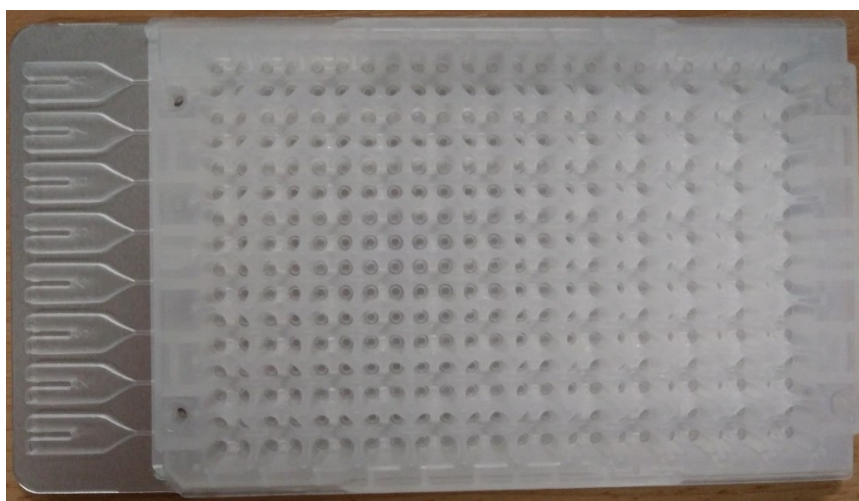
#### IV.7.1.1 Relativní kvantifikace miRNA v uspořádání array

Do reakce na real-time PCR bylo podle protokolu smícháno:

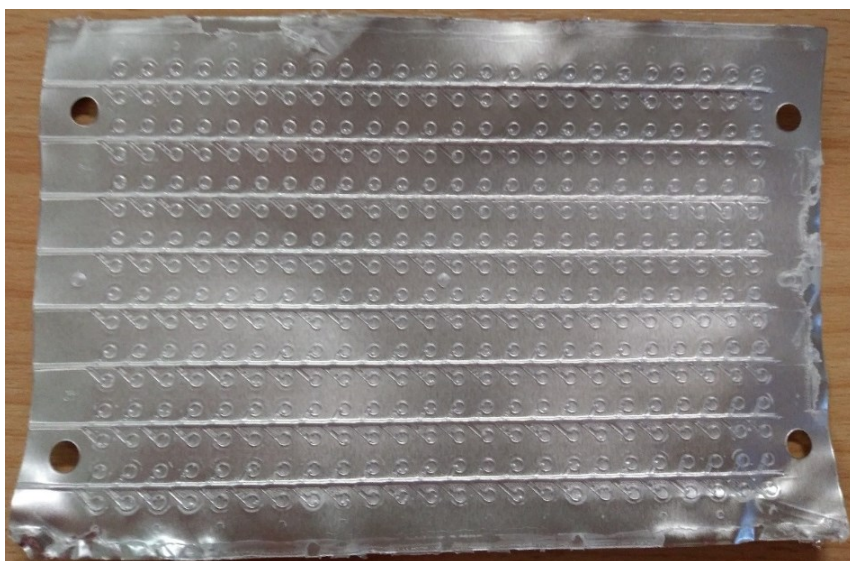
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2x</i>	450 µl
Voda	441 µl
Preamplifikované miRNA	9 µl

Tento mix byl nanesen na kartu *TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1* (Applied Biosystems™, CA, USA), vzhled karty na obrázku 10 a 11. Seznam miRNA a jejich rozložení na kartě v tabulce 19 a na obrázku 14 v dodatku. Karta byla dvakrát stočena (331 g, 1 min, ramp rate/stupeň akcelerace 3) na centrifuze Multifuge 3L (Heraeus, Německo). Poté byla karta uzavřena pomocí pečetidla (Obrázek 12) a rezervoáry pro plnění byly odstřiženy.

Real-time PCR miRNA z moči proběhlo v ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) při podmínkách uvedených v tabulce 8.



Obrázek 10: **Fotografie TaqMan® Low Density Array Card**



Obrázek 11: **Fotografie vnitřku TaqMan® Low Density Array Card**, kde jsou vidět jednotlivé jamky a kanálky, pro přívod vzorku z rezervoárů, které by byly vlevo, v této fázi jsou odstřiženy



Obrázek 12: **Pečetidlo** na TaqMan® Low Density Array Card

Tabulka 8: **Nastavení teplot pro real-time PCR**

	Teplota	Čas
1x	50 °C	2 min
1x	95 °C	10 min
40x	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
1x	4 °C	∞

#### IV.7.1.2 Relativní kvantifikace miRNA v jednotlivých assayích

Do reakce na real-time PCR bylo podle protokolu smícháno:

<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG</i>	8 µl
miRNA primery + próba	0,8 µl
Voda	3,2 µl
miRNA z reverzní transkripce	4 µl

Destička byla stočena 680 g, 90 s na centrifuze 5430 (Eppendorf, Německo).

Real-time PCR miRNA z moči proběhlo v ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) při podmínkách uvedených v tabulce 8.

#### IV.7.2 Absolutní kvantifikace cfDNA

Pro absolutní kvantifikaci cfDNA v moči byl použit stroj ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) a metoda real-time PCR. Pro tvorbu standardní křivky byl použit gen *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (GenBank: NG\_007073.2, PeBiosystems, Foster City, CA, USA). Standardní křivka byla vytvořena sériovým ředěním standardní genomické DNA (*TaqMan Control Genomic DNA* (Human), 10 ng/µl, Applied Biosystems, USA) se sedmi body o koncentraci DNA v jednotlivých bodech křivky: 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,5 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,125 ng/µl, 62,5 pg/µl a 31,25 pg/µl.

Do reakce na real-time PCR bylo podle protokolu smícháno:

<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG</i>	10 µl
GAPDH primery + próba	1,4 µl
Voda	3,6 µl
DNA (standardní nebo vyizolovaná z moči)	5 µl

Destička byla stočena 680 g, 90 s na centrifuze 5430 (Eppendorf, Německo).

Real-time PCR cfDNA z moči proběhlo v ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems™, CA, USA) při podmínkách uvedených v tabulce 8.

Vzorky byly na destičku nanášeny v triplikátech.



#### IV.7.3 Statistická analýza dat

Výsledky byly zpracovány statistikem v programech ExpressionSuite Software v1.0.3 (Applied Biosystems™, CA, USA), qBase<sup>+</sup> v2.4 (Biogazelle, Belgium), Statistica software verze 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), G\*Power verze 3.1.9.2 (Franz Faul, Universität Kiel, Germany), The Waikato Environment for Knowledge Analysis (Weka) software (Eibe, Hall et al. 2016) (University of Waikato, New Zealand) a MedCalc (MedCalc Software, Belgium).

##### *IV.7.3.1 Výběr miRNA endokontrol k normalizaci výsledků z jednotlivých assayí*

K výběru endokontrol byl použit algoritmus geNorm v programu qBase<sup>+</sup>. Do programu qBase<sup>+</sup> byly vloženy výsledky amplifikovaných miRNA z arrayí a miRNA exprimované u všech kontrol i pacientů byly vloženy do algoritmu geNorm jako kandidátní endokontroly. Algoritmus na základě stability exprese jednotlivých miRNA u pacientů a kontrol vybral nejstabilnější kombinaci miRNA, která byla posléze použita pro normalizaci výsledků pro jednotlivé assaye. Celý tento proces byl použit, protože jednotlivé assaye není vhodné normalizovat metodou globálního průměru (*Global mean*) vzhledem k jejich malému počtu a způsobu jejich výběru.

##### *IV.7.3.2 Analýza miRNA ze supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře*

Pro statistickou analýzu dat byl použit Man-Whitneyův U test s Benjamini-Hochbergovou korekcí v programech qBase<sup>+</sup> a Statistica software verze 10. V programu G\*Power byla vypočtena efektivní velikost porovnávaných skupin pro třetí fázi studie. Výpočet byl proveden statistikem pomocí Weka software a byl založen na datech z druhé fáze a efektivní velikost porovnávaných skupin byla vypočtena pro použití s Man-Whitneyovým U testem pro porovnání skupiny pacientů a kontrol.

K určení diagnostické síly miRNA vybraných ve třetí fázi studie byl statistikem pomocí Weka software sestaven alternující rozhodovací strom.

#### *IV.7.3.3 Analýza cfDNA ze supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře*

Pro statistickou analýzu dat byly aplikovány neparametrické testy (Statistica software verze 10). Pro porovnání koncentrace cfDNA v moči s celkovým množstvím cfDNA ve vymočeném objemu byl použit Wilcoxonův test pro párové vzorky. Pro zhodnocení vztahu mezi koncentrací a celkovým množstvím cfDNA byla použita regresní analýza. K porovnání celkového množství cfDNA a její koncentrace mezi pacienty a kontrolami byl použit Mann-Whitneyův test pro nezávislé vzorky. Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami kontrol, pacientů s rakovinou močového měchýře a pacientů s benigním urologickým onemocněním byl použit Kruskal-Wallisův test. Párové srovnání podskupin pacientů s rakovinou močového měchýře bylo provedeno Mann-Whitneyovým testem s Bonferoniho korekcí.

#### *IV.7.4 Bioinformatická analýza výsledků*

Za využití miRWalk databáze (Dweep, Gretz et al. 2014) byly vyhledány validované cílové geny nalezených miRNA. Takto selektované sety genů byly dále analyzovány za pomoci databáze DAVID (*Database for Annotation, Visualization and, Integrated Discovery*) (Huang, Sherman et al. 2008, Huang, Sherman et al. 2009) s cílem najít funkčně vymezené klastry genů za podmínek střední klasifikační stringence a aplikace Benjaminiho korekce.

## V Výsledky

### V.1 miRNA v moči

#### V.1.1 První fáze

Na začátku studie bylo potřeba vybrat vhodné miRNA s potenciálem rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol a zároveň vybrat vhodnou normalizační metodu použitelnou pro supernatant moči. Bylo vyšetřeno 13 kontrol a 46 pacientů (Tabulka 2). Jako výhodná metoda byly použity TaqMan array karty se 381 miRNA (Tabulka 19 a obrázek 14 v dodatku), jejichž výhodou je analýza velkého množství miRNA v jednom experimentu.

miRNA byly izolovány ze supernatantu druhé ranní moči (získaná cca 2 h po první ranní moči).

U všech 59 jedinců bylo detekováno celkem 31 miRNA a u žádného z nich 61 miRNA z 381 miRNA na array kartě (Tabulka 9).

Tabulka 9: *miRNA z array karty, které se vyskytovaly u všech z 59 jedinců nebo u žádného z první fáze*

miRNA, které má všech 59 jedinců		miRNA, které nemá žádný z 59 jedinců			
MammU6	miR-203	miR-1	miR-33b	miR-490-3p	miR-556-3p
let-7c	miR-204	miR-129-5p	miR-346	miR-491-3p	miR-556-5p
let-7e	miR-21	miR-153	miR-369-3p	miR-496	miR-561
miR-100	miR-24	miR-154	miR-369-5p	miR-499-5p	miR-582-5p
miR-106a	miR-26a	miR-188-3p	miR-371-3p	miR-501-3p	miR-624
miR-125b	miR-27b	miR-208b	miR-377	miR-504	miR-674
miR-146a	miR-28-3p	miR-211	miR-380	miR-507	miR-872
miR-146b-5p	miR-29a	miR-216a	miR-383	miR-508-5p	miR-875-3p
miR-17	miR-30b	miR-219-2-3p	miR-384	miR-509-3-5p	miR-876-3p
miR-191	miR-30c	miR-220b	miR-409-5p	miR-518a-5p	miR-885-3p
miR-192	miR-31	miR-220c	miR-431	miR-520a-3p	miR-887
miR-194	miR-532-3p	miR-299-3p	miR-448	miR-521	miR-891b
miR-197	miR-886-3p	miR-299-5p	miR-450b-3p	miR-524-5p	miR-892a
miR-19b	miR-886-5p	miR-325	miR-453	miR-544	
miR-200b	miR-99b	miR-330-5p	miR-485-5p	miR-548a-5p	
miR-200c		miR-339-5p	miR-487a	miR-548b-3p	

Dále byl hledán vhodný způsob normalizace, protože nebyla k dispozici žádná vhodná, ustálená a vědeckou obcí uznávaná endokontrola pro miRNA v supernatantu moči (Tabulka 1). V tomto ohledu byly array karty také velkou výhodou, protože díky velkému počtu miRNA na jedné kartě bylo možné udělat normalizaci pomocí globálního průměru, který je vypočítán z průměru Ct (*Cycle of threshold* – cyklus prahu – počet cyklů PCR, než fluorescence ve vzorku překročí hladinu pozadí) na konkrétní kartě a k němu jsou pak vztahovány ostatní hodnoty Ct. Na základě Mann-Whitneyova testu s Benjamini-Hochbergovou korekcí a normalizací na globální průměr vyšlo 59 miRNA signifikantně rozdílných mezi pacienty a kontrolami (Tabulka 10), z toho mělo 16 sníženou a 43 zvýšenou expresi.

*Tabulka 10: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami na základě normalizace na globální průměr*

*Poměr = abundance dotyčné miRNA v močovém supernatantu zdravých kontrol vůči abundanci u pacientů*

*Modře jsou označeny miRNA, které mají sníženou expresi u pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-16	0,00037	0,06344
miR-124	0,00154	0,09357
miR-425	0,00154	0,05091
miR-93	0,00154	0,17783
RNU48	0,00154	0,07305
miR-150	0,00293	0,07184
miR-15b	0,00293	0,09106
miR-342-3p	0,00478	0,13391
miR-106b	0,00484	0,12746
miR-200c	0,00624	0,33840
miR-99a	0,00689	4,30177
miR-130b	0,00689	0,14052
miR-100	0,00689	3,25875
miR-205	0,00803	0,07175
miR-125b	0,00851	5,05870
miR-210	0,00950	0,04599
miR-146a	0,01062	0,22028
miR-107	0,01066	5,81236
miR-223	0,01425	0,08057
miR-212	0,01471	0,15239
miR-320	0,01471	0,36427
miR-192	0,01501	2,73479
miR-181a	0,01533	0,28545
let-7c	0,01568	2,75861
miR-24	0,01570	0,47042
miR-423-5p	0,01570	0,17851
miR-155	0,01626	0,08613

*Tabulka 10 – POKRAČOVÁNÍ 1: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami na základě normalizace na globální průměr*

*Poměr = abundance dotyčné miRNA v močovém supernatantu zdravých kontrol vůči abundanci u pacientů*

*Modře jsou označeny miRNA, které mají sníženou expresi u pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-142-3p	0,01679	0,08863
miR-106a	0,01679	0,38998
miR-652	0,01729	0,08766
miR-31	0,01729	0,32263
miR-202	0,01729	0,08869
miR-590-5p	0,01729	0,24415
miR-302c	0,01744	1900,07478
miR-20a	0,01744	0,40240
miR-25	0,01744	0,27720
miR-127-3p	0,02003	4,97223
miR-186	0,02019	0,22381
miR-195	0,02054	0,15906
miR-182	0,02054	0,28564
miR-532-3p	0,02212	2,57583
miR-19a	0,02294	0,19997
miR-22	0,02448	0,02478
miR-345	0,02525	0,26283
miR-365	0,02625	0,08288
miR-548b-3p	0,02928	18303,84969
MammU6	0,02928	0,10235
miR-19b	0,03613	0,26880
miR-204	0,03747	3,04163
miR-141	0,03887	0,40515
miR-208	0,03904	322,13342
miR-193b	0,04587	0,42319
miR-30c	0,04587	2,16873
miR-30b	0,04758	2,17927
miR-519d	0,04971	192,42673

*Tabulka 10 – POKRAČOVÁNÍ 2: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami na základě normalizace na globální průměr*

*Poměr = abundance dotyčné miRNA v močovém supernatantu zdravých kontrol vůči abundanci u pacientů*

*Modře jsou označeny miRNA, které mají sníženou expresi u pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-484	0,04971	0,26452
miR-17	0,04971	0,39305
miR-324-5p	0,04971	0,54217
<b>miR-521</b>	0,04984	79,09819

Vzhledem k tomu, že výsledky je nutné validovat jinou metodou a v další fázi není normalizace na globální průměr proveditelná, bylo nutné vybrat jiný způsob normalizace. K tomu pomohl algoritmus geNorm v programu qBase<sup>+</sup>®. Tento algoritmus vybere geny – v našem případě miRNA, které jsou v souboru nejstabilnější a ty navrhne jako normalizační. Za pomoci tohoto algoritmu byly vybrány tři miRNA jako endokontroly: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

Na základě normalizace pomocí endokontrol bylo Mann-Whitneyovým testem s Benjamini-Hochbergovou korekcí u kontrol a pacientů signifikantně rozdílně exprimováno 61 miRNA, z toho 7 mělo zvýšenou a 54 sníženou expresi (Tabulka 11).

*Tabulka 11: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami na základě normalizace na 3 endokontroly*

*Modře jsou označeny miRNA, které mají sníženou expresi u pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-107	0,00007	14,82575
miR-99a	0,00012	12,51027
let-7c	0,00021	8,02251
miR-100	0,00025	9,47699
miR-125b	0,00037	14,71156
miR-502-3p	0,00075	6,34053
miR-532-3p	0,00075	7,49094
miR-192	0,00075	7,95324
miR-30c	0,00089	6,30704
miR-30b	0,00089	6,33770
miR-127-3p	0,00089	14,13891
miR-16	0,00106	0,16509
miR-26a	0,00154	2,85823
miR-204	0,00211	8,84556
miR-152	0,00410	3,28487
miR-135a	0,00410	8,16673
miR-425	0,00417	0,13871
miR-26b	0,00417	2,96820
miR-215	0,00417	6,32689
miR-375	0,00417	8,97353
miR-27b	0,00458	4,43019
miR-323-3p	0,00530	8,93309
miR-218	0,00555	4,74054
miR-532-5p	0,00587	3,43725
miR-302c	0,00587	4783,47505
let-7d	0,00796	3,18277
miR-886-3p	0,00938	4,97473
miR-194	0,00953	7,70201
miR-208	0,00953	788,34605
miR-455-3p	0,01007	8,54122
miR-29a	0,01065	2,93189
let-7e	0,01272	3,35578
miR-362-5p	0,01272	6,18278
miR-377	0,01272	22,18778



*Tabulka 11 – POKRAČOVÁNÍ: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami na základě normalizace na 3 endokontroly*

*Modře jsou označeny miRNA, které mají sníženou expresi u pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-124	0,01291	0,27213
miR-520d-5p	0,01291	82,20977
miR-636	0,01415	152,26152
miR-521	0,01415	265,89115
miR-367	0,01720	59,79280
miR-210	0,01822	0,13629
miR-518f	0,01822	224,83115
miR-598	0,02178	3,71985
miR-376a	0,02186	15,83328
miR-519d	0,02403	483,91634
miR-140-5p	0,02884	2,86308
miR-548b-3p	0,02935	67243,63644
miR-147	0,03009	23,14953
miR-99b	0,03039	2,29828
miR-429	0,03747	2,51305
miR-15b	0,03789	0,27157
miR-518b	0,03867	2351,15714
miR-93	0,03880	0,46274
miR-489	0,03880	2,43704
miR-28-5p	0,03883	2,08923
miR-548a-3p	0,03883	6,14993
miR-200a	0,04107	1,74130
miR-95	0,04202	4,12440
miR-886-5p	0,04680	3,23973
RNU48	0,04726	0,21714
miR-660	0,04726	2,62506
miR-376c	0,04726	5,39873

23 miRNA vyšlo signifikantně rozdílných oběma způsoby normalizace a u všech se shoduje, zda mají zvýšenou nebo sníženou expresi (Tabulka 12).

*Tabulka 12: miRNA se signifikantní změnou exprese mezi pacienty s rakovinou močového měchýře a kontrolami při obou metodách normalizace*

*Červeně označené miRNA byly použity ve druhé fázi studie*

miRNA	Normalizace na endokontroly		Normalizace na globální průměr	
	p hodnota	Poměr	p hodnota	Poměr
let-7c	0,00007	14,82575	0,01568	2,75861
miR-100	0,00025	9,47699	0,00689	3,25875
miR-107	0,00007	14,82575	0,01066	5,81236
miR-124	0,01291	0,27213	0,00154	0,09357
miR-125b	0,00037	14,71156	0,00851	5,05870
miR-127-3p	0,00089	14,13891	0,02003	4,97223
miR-15b	0,03789	0,27157	0,00293	0,09106
miR-16	0,00106	0,16509	0,00037	0,06344
miR-192	0,00075	7,95324	0,01501	2,73479
miR-204	0,00211	8,84556	0,03747	3,04163
miR-208	0,00953	788,34605	0,03904	322,13342
miR-210	0,01822	0,13629	0,00950	0,04599
miR-302c	0,00587	4783,47505	0,01744	1900,07478
miR-30b	0,00089	6,33770	0,04758	2,17927
miR-30c	0,00089	6,30704	0,04587	2,16873
miR-425	0,00417	0,13871	0,00154	0,05091
miR-519d	0,02403	483,91634	0,04971	192,42673
miR-521	0,01415	265,89115	0,04984	79,09819
miR-532-3p	0,00075	7,49094	0,02212	2,57583
miR-548b-3p	0,02935	67243,63644	0,02928	18303,84969
miR-93	0,03880	0,46274	0,00154	0,17783
miR-99a	0,00012	12,51027	0,00689	4,30177
RNU48	0,04726	0,21714	0,00154	0,07305

Na základě výše zmíněných výsledků bylo vybráno celkem 13 miRNA pro použití ve druhé fázi. Kromě devíti vybraných na základě nízké p hodnoty a zároveň vysokého nebo nízkého poměru mezi pacienty a kontrolami (Tabulka 12, červeně označené), byly vybrány čtyři miRNA (miR-199a-3p, miR-301a, miR-372 a miR-519a), které se zdály výrazněji zastoupené u pacientů než u kontrol.

### V.1.2 Druhá fáze studie miRNA v močovém supernatantu

Ve druhé fázi studie byly ověřovány výsledky z první fáze na stejném souboru jedinců (13 kontrol a 46 pacientů s rakovinou močového měchýře - tabulka 2), ale metodou jednotlivých assayí pro 13 miRNA, které byly vybrány v první fázi (let-7c, miR-125b, miR-16, miR-204, miR-30b, miR425, miR-532-3p, miR-93, miR-99a, miR-199a-3p, miR-301a, miR-372 a miR-519a).

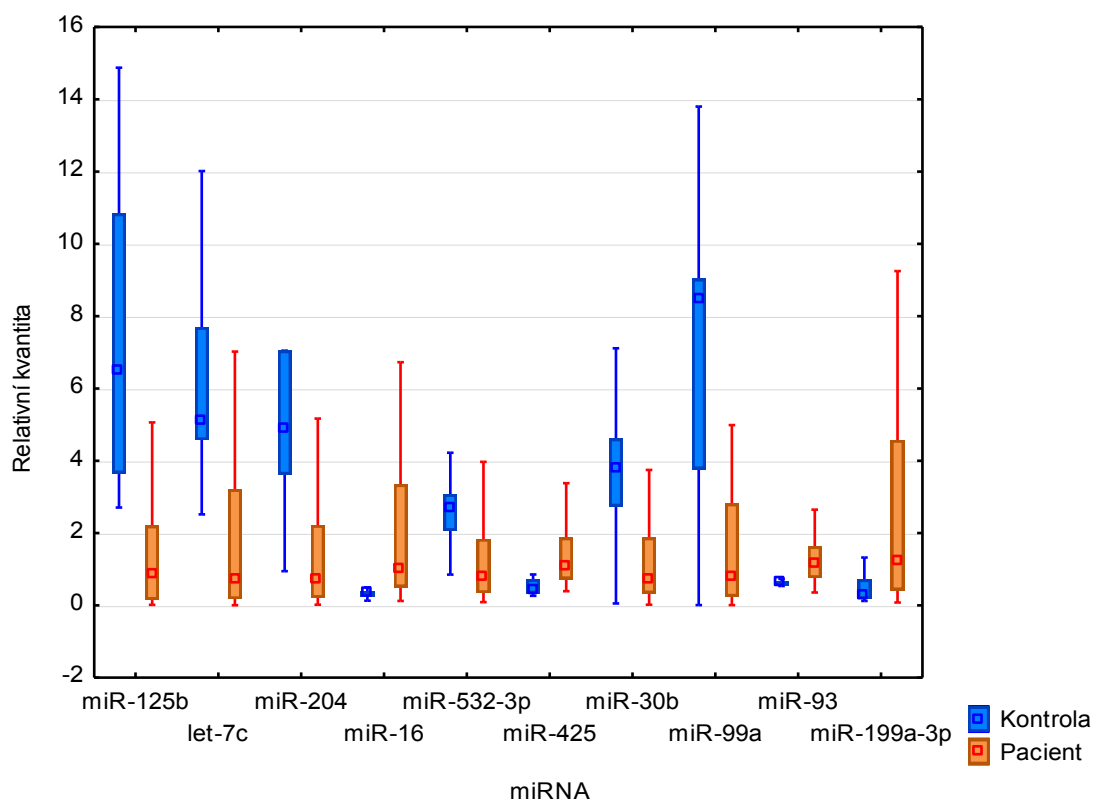
Tato fáze byla určena k potvrzení výsledků získaných v první fázi jinou metodou. V první fázi byly použity array karty, v druhé fázi byly použity assaye pro jednotlivé miRNA.

miRNA byly izolovány z druhého dílu supernatantu druhé ranní moči a výsledky byly normalizovány na tři endokontroly vybrané algoritmem geNorm: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

Ve druhé fázi byly potvrzeny Mann-Whitneyovým testem s Benjamini-Hochbergovou korekcí signifikantní rozdíly v expresi u 10 ze 13 miRNA, které byly vybrány v první fázi (Tabulka 13, graf 1).

*Tabulka 13: Výsledky druhé fáze – porovnání exprese miRNA u kontrol a pacientů*

<b>miRNA</b>	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr</b>
miR-125b	0,00006	11,774
let-7c	0,00008	9,18
miR-204	0,00016	7,986
miR-16	0,0002	0,229
miR-532-3p	0,0002	3,192
miR-425	0,0002	0,421
miR-30b	0,00055	3,603
miR-99a	0,00059	6,085
miR-93	0,00064	0,535
miR-199a-3p	0,00596	0,296



**Graf 1: Krabicový graf výsledků druhé fáze: porovnání expresí miRNA u kontrol a pacientů**

Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil.

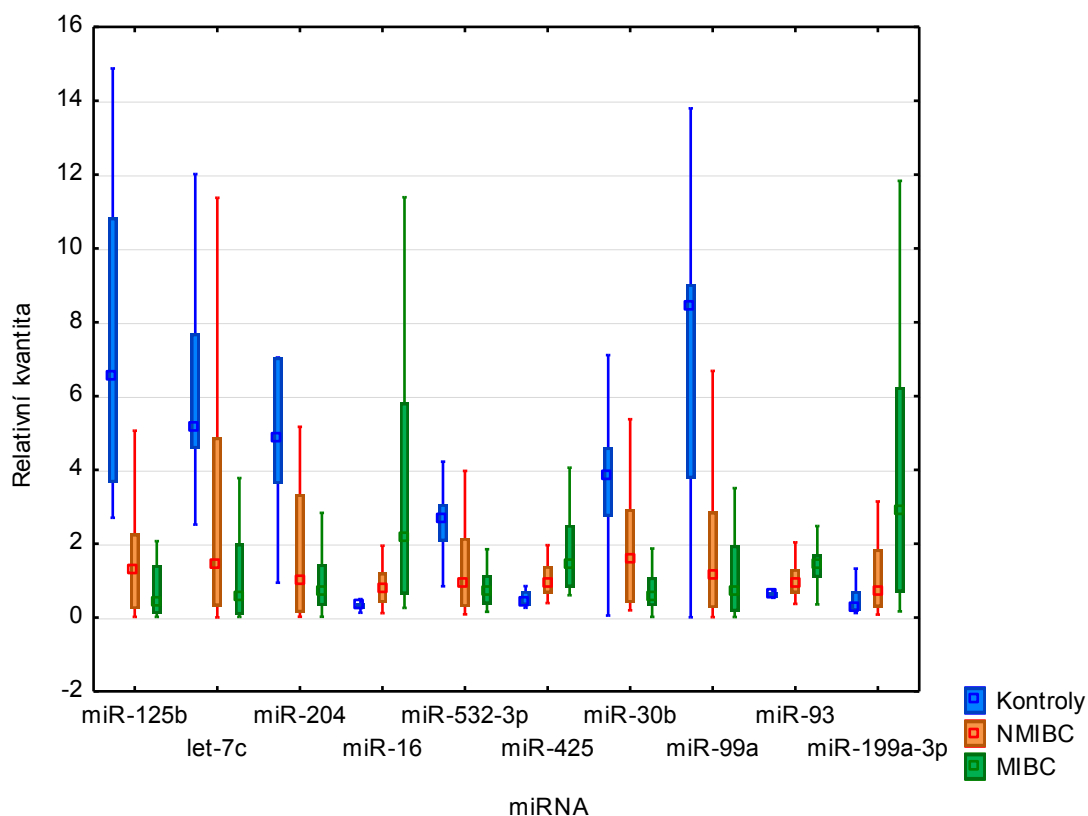
Při klasifikaci rakoviny močového měchýře je používáno několik přístupů (podrobněji v III.3.1). Pro strategii léčby je důležité rozdělení na NMIBC (*non-muscle invasive bladder cancer* – rakovina močového měchýře neinvadující do svalů) a MIBC (*muscle invasive bladder cancer* – do svalů invadující rakovina močového měchýře). Stádia pTa-pT4 určují biologickou charakteristiku, LG a HG diferenciaci tumoru a jsou také podstatné při výběru vhodné léčby zvláště u nižších stádií.

Naše studie se dále zaměřila na rozdíly exprese miRNA u pacientů s NMIBC (pTa a pT1 – 22 pacientů) a MIBC (pT2-pT4 – 24 pacientů) a u kontrol (13 jedinců). Pomocí Kruskal-Wallisova ANOVA testu byly porovnávány tyto tři skupiny. Statisticky signifikantní rozdíly v expresi miRNA byly pozorovány mezi kontrolami a oběma skupinami pacientů. Pouze exprese miR-199a-3p vykazovala statisticky signifikantní

rozdíl jen mezi kontrolami a MIBC skupinou. Mezi NMIBC a MIBC skupinami nebyly statisticky významné rozdíly v zastoupení žádných miRNA v močovém supernatantu (Tabulka 14, graf 2).

*Tabulka 14: Výsledky druhé fáze při porovnání expresí miRNA u kontrol a skupin pacientů NMIBC a MIBC*

miRNA	p hodnota		
	Kontroly x NMIBC	Kontroly x MIBC	NMIBC x MIBC
miR-125b	0,0015	<0,0001	0,4530
let-7c	0,0032	<0,0001	0,3626
miR-204	0,0020	0,0002	1
miR-16	0,0203	<0,0001	0,1429
miR-532-3p	0,0051	0,0003	1
miR-425	0,0198	<0,0001	0,2107
miR-30b	0,0454	0,0001	0,1853
miR-99a	0,0154	0,0009	1
miR-93	0,0475	0,0003	0,2782
miR-199a-3p	0,3833	0,0012	0,0607



*Graf 2: Krabicový graf výsledků druhé fáze: porovnání exprese miRNA v močovém supernatantu u kontrol a skupin pacientů NMIBC a MIBC*

*Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil.*

### V.1.3 Třetí fáze studie miRNA v močovém supernatantu

Účelem třetí fáze bylo validovat výsledky předchozích dvou fází na novém souboru jedinců. K normalizaci byly použity tři endokontroly vybrané algoritmem geNorm: miR-191, miR-28-3p a miR-200b, stejně jako ve druhé fázi. Metoda detekce miRNA byla také stejná – assaye pro jednotlivé miRNA.

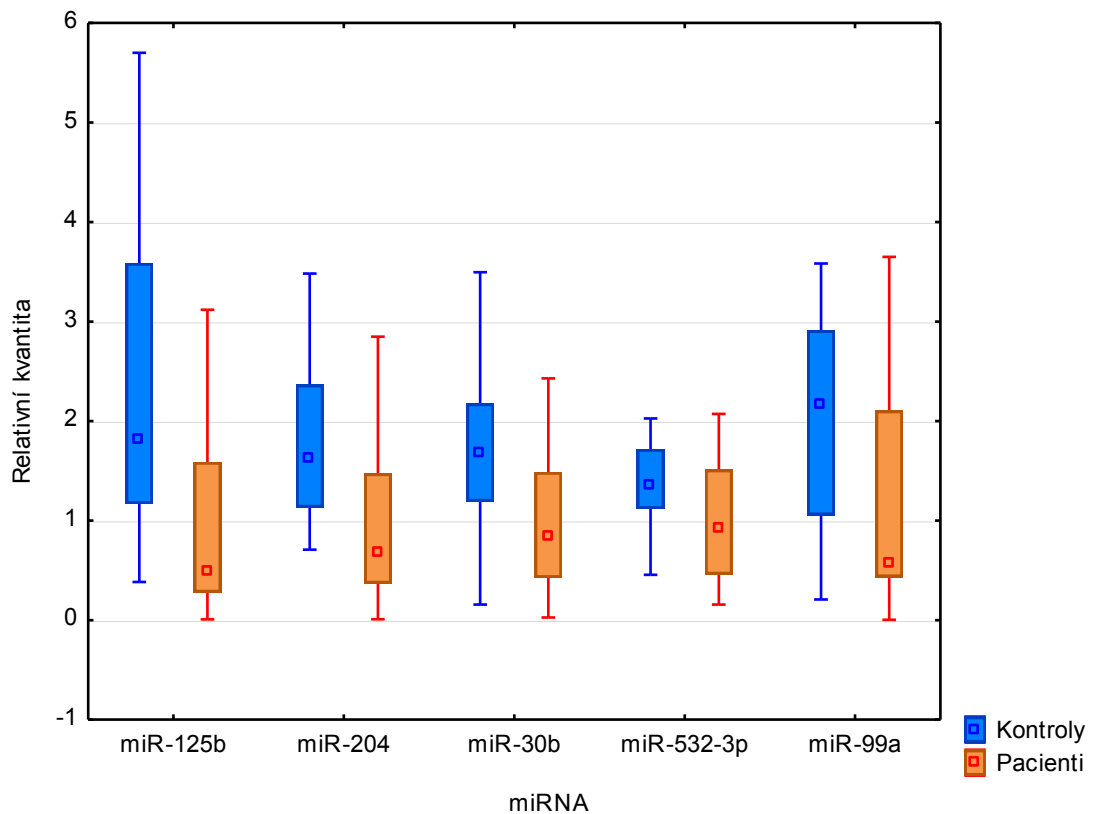
Za použití výsledků z druhé fáze byla provedena power analýza k určení efektivní velikosti porovnávaných skupin. Power analýza určila minimální velikost souborů kontrol i pacientů mezi sedmi a 21 jedinci pro všechny miRNA vybrané ve druhé fázi. Proto byl soubor o 23 kontrolách a 27 pacientech ve třetí fázi dostatečně velký.

I přes to, že všichni zařazení pacienti s rakovinou močového měchýře byli diagnosticky specifikováni do stádií pTa-pT2, power analýza určila příliš velkou početnost souborů pro testování rozdílů expresí miRNA mezi jednotlivými stádii. Proto je tato fáze zaměřená pouze na určení rozdílů mezi kontrolami a pacienty. Aby byla testována schopnost rozpoznat pacienty s nižšími stádii rakoviny močového měchýře, nejsou zařazení pacienti se stádii pT3 a pT4. Zároveň bylo do souboru kontrol zařazeno i pět pacientů s benigním urologickým onemocněním, aby se soubor přiblížil klinické praxi (Tabulka 3).

Na novém souboru vzorků byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi pacienty a kontrolami v expresi pěti miRNA miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p. Všech pět miRNA mělo sníženou expresi v supernatantu moči pacientů oproti moči kontrol (Tabulka 15, graf 3).

*Tabulka 15: Výsledky třetí fáze: porovnání expresí miRNA u kontrol a pacientů*

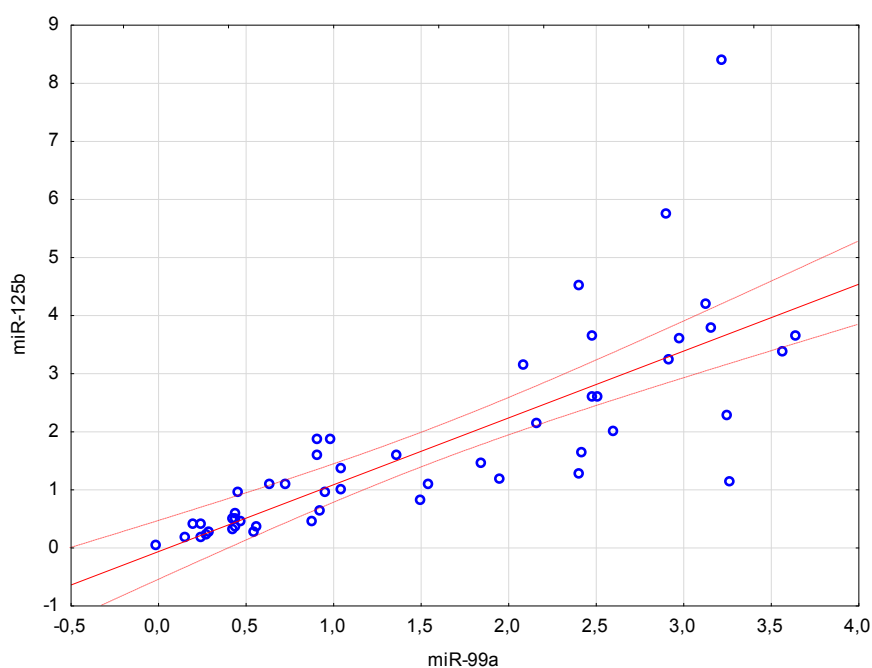
	<b>p hodnota</b>	<b>Poměr (kontroly/ pacienti)</b>	<b>Senzitivita [%]</b>	<b>Specifická [%]</b>	<b>Plocha pod křivkou</b>	<b>Cut-off hodnota</b>
miR-125b	<0,0001	3,50	59,26	95,65	0,801	≤0,618
miR-204	0,0001	3,00	53,85	100,00	0,771	≤0,703
miR-99a	0,0019	2,67	74,07	82,61	0,738	≤1,003
miR-30b	0,0002	2,10	66,67	82,61	0,760	≤1,115
miR-532-3p	0,0031	1,64	59,26	86,96	0,718	≤1,002



*Graf 3: Krabicový graf výsledků třetí fáze: porovnání expresí miRNA u kontrol a pacientů*  
*Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil.*

Mezi expresí miR-99a a miR-125b byla nalezena korelace ( $r=0,89$ ,  $p<0,0001$ ) (Graf 4), proto byla pomocí databází miRWalk a DAVID provedena bioinformatická analýza validovaných cílů a jejich potenciálních rolí v regulaci buněčného cyklu a růstu nádoru. Výsledky naznačují, že obě miRNA jsou schopny regulovat velké soubory genů z drah, které hrají zásadní roli při karcinogenezi, zvláště u rakoviny močového měchýře. Nejsignifikantnější výsledky této analýzy jsou v tabulce 16.



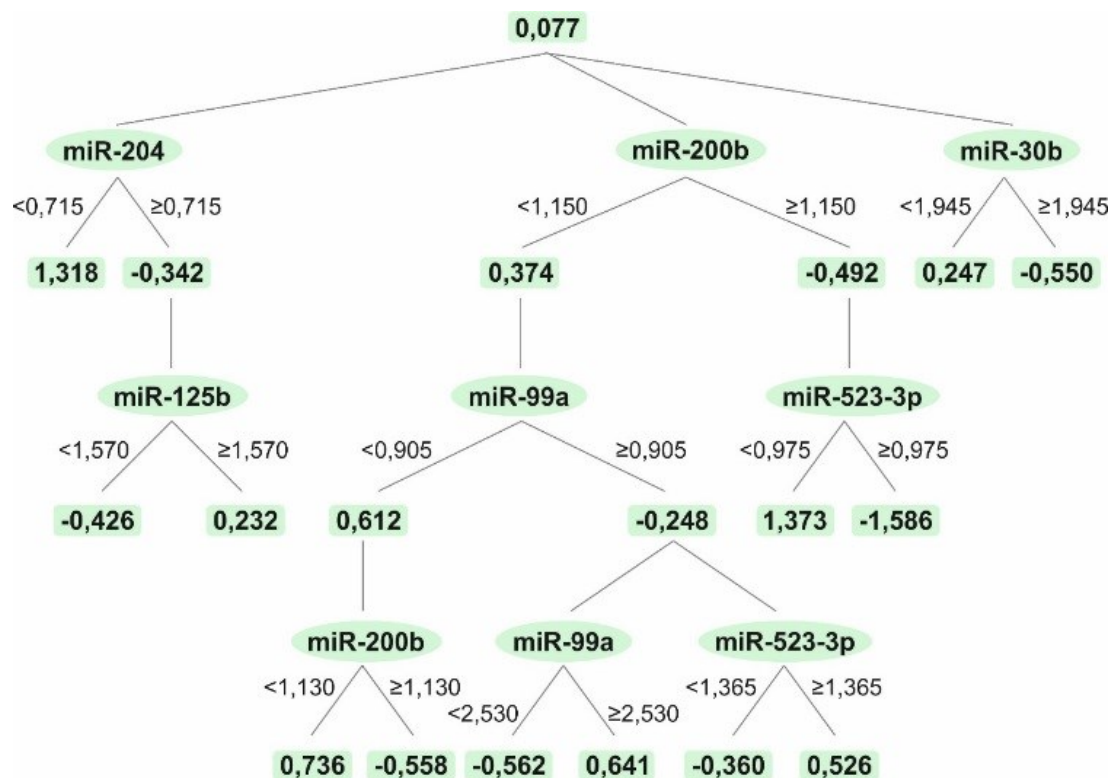


Graf 4: Korelace expresí miR-99a a miR-125b ( $r=0,89$ ,  $p<0,0001$ )

Tabulka 16: Vybrané dráhy, které jsou regulované miR-99a nebo miR-125b

Dráha	p hodnota po Benjaminiho korekci	Počet genů
Regulace apoptózy	$1,8 \times 10^{-22}$	64
Regulace transkripce RNA polymerázou II	$6,5 \times 10^{-23}$	62
Odpověď na organické látky	$1,4 \times 10^{-16}$	52
Odpověď na stimuly steroidních hormonů	$1,9 \times 10^{-13}$	26
Odpověď na cyklické organické látky	$3,5 \times 10^{-6}$	14
Regulace vazby DNA	$1,2 \times 10^{-13}$	22
Rakovina močového měchýře	$4,3 \times 10^{-11}$	15
Vaskularizace	$2,2 \times 10^{-5}$	18

Pro případný vývoj diagnostické metody byl kromě senzitivity, specifity a plochy pod křivkou (Tabulka 15), ve spolupráci se statistikem za pomoci softwaru Weka sestaven alternující rozhodovací strom, který na základě kombinace miR-125b, miR-204, miR-532-3p a miR-99a dosáhl AUC=0,836, senzitivity 80 % a specifity 71 % (Obrázek 13).



Obrázek 13: **Alternující rozhodovací strom**

Oválně orámované jsou predikční uzly stromu – jednotlivé miRNA. Hranatě orámované jsou rozhodovací uzly stromu, které vyjadřují skóre důvěry (a measure of confidence). Čísla nad větvením jsou rozdělovací hodnoty – hodnoty relativní kvantity dané miRNA.

Pokud je skóre důvěry záporné, strom přiřazuje jedince do třídy „kontrola“, pokud je skóre důvěry kladné, strom přiřazuje jedince do třídy „pacient“.

Strom dosáhl AUC=0,836, senzitivity 80 % a specificity 71 %.

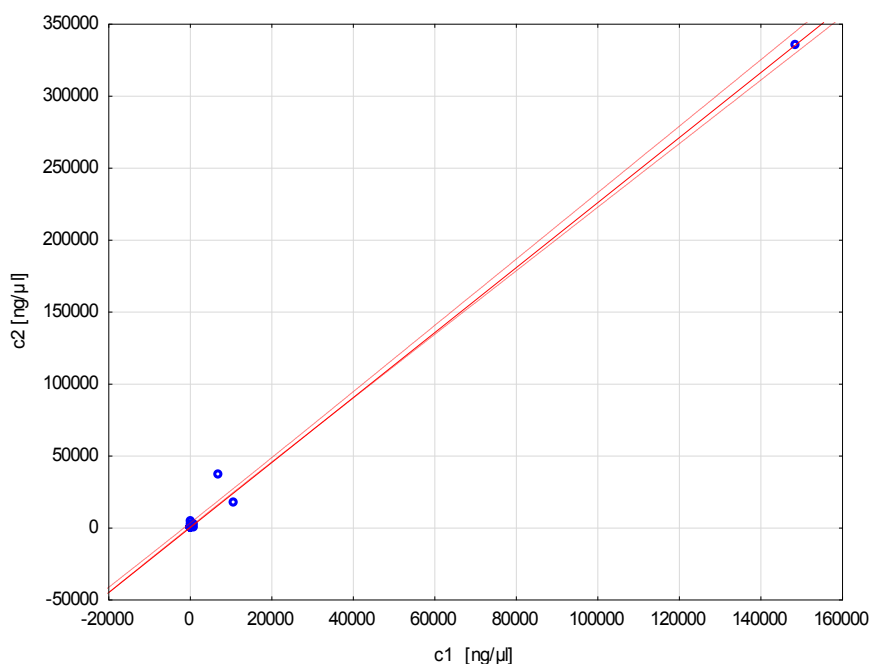
## V.2 cfDNA v moči

Moč je ideálním zdrojem volných nukleových kyselin a vzhledem k přímému kontaktu se sliznicí močového měchýře je ideálním médiem ke zkoumání močové cfDNA. Naším cílem tedy bylo zaměřit se na standardizaci metodiky kvantifikace cfDNA v supernatantu moči a její využití k odlišení zdravých kontrol a pacientů bez rakoviny od pacientů s rakovinou močového měchýře.

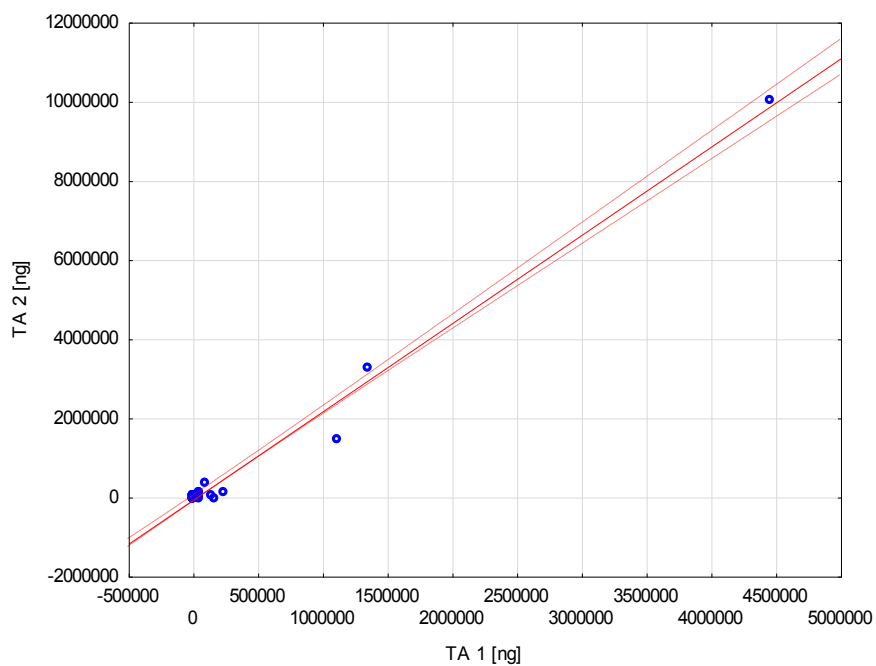
### V.2.1 Výběr vhodného času pro odběr moči

Jako první bylo zkoumáno, zdali je vhodnější první ranní moč, která je nejčastěji používána k diagnostickým účelům, nebo druhá ranní moč (získaná cca 2 h po první ranní moči), jako zdroj cfDNA. Při odběru byl zaznamenán celkový objem moči ( $V$ , [ml]). Izolována a analyzována byla první a druhá ranní moč 27 jedinců (11 zdravých dobrovolníků, 6 pacientů s benigními urologickými onemocněními a 10 pacientů s rakovinou močového měchýře) ke stanovení koncentrací močové cfDNA ( $c$ , [ng/ml]).

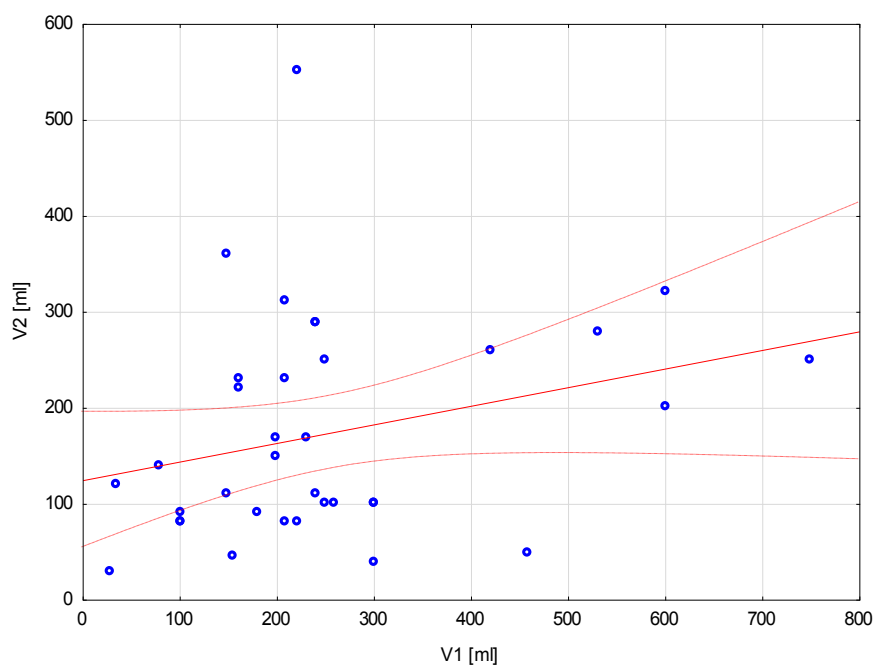
Koncentrace cfDNA prvních ranních močí ( $c_1$ ) korelovala s koncentracemi druhých ranních močí ( $c_2$ ) ( $r=0,997926$ ) (Graf 5). Stejně tak korelovalo celkové množství ( $TA = c \times V$ ) ( $TA$ , *total amount*) cfDNA prvních a druhých ranních močí ( $r=0,993139$ ) (Graf 6). Naopak žádná korelace nebyla mezi objemy ( $V_1$  a  $V_2$ ) ( $r=0,279090$ ) (Graf 7).



**Graf 5: Korelace koncentrací cfDNA prvních ( $c_1$ ) a druhých ( $c_2$ ) ranních močí ( $r=0,997926$ )**

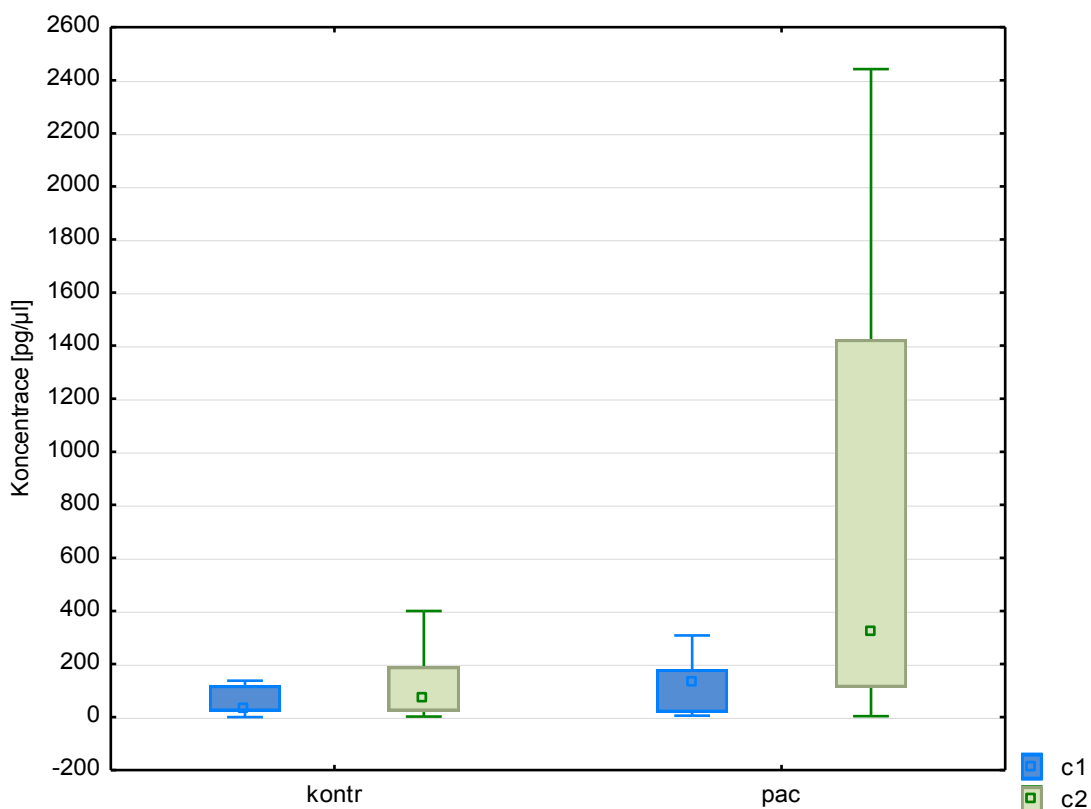


*Graf 6: Korelace celkových množství cfDNA prvních (TA 1) a druhých (TA 2) ranních močí ( $r=0,993139$ )*



*Graf 7: Korelace objemů prvních (V 1) a druhých (V 2) ranních močí ( $r=0,279090$ )*

V koncentracích močové cfDNA u kontrol nebyly rozdíly, zatímco u pacientů s rakovinou močového měchýře koncentrace močové cfDNA velmi kolísala (Graf 8).



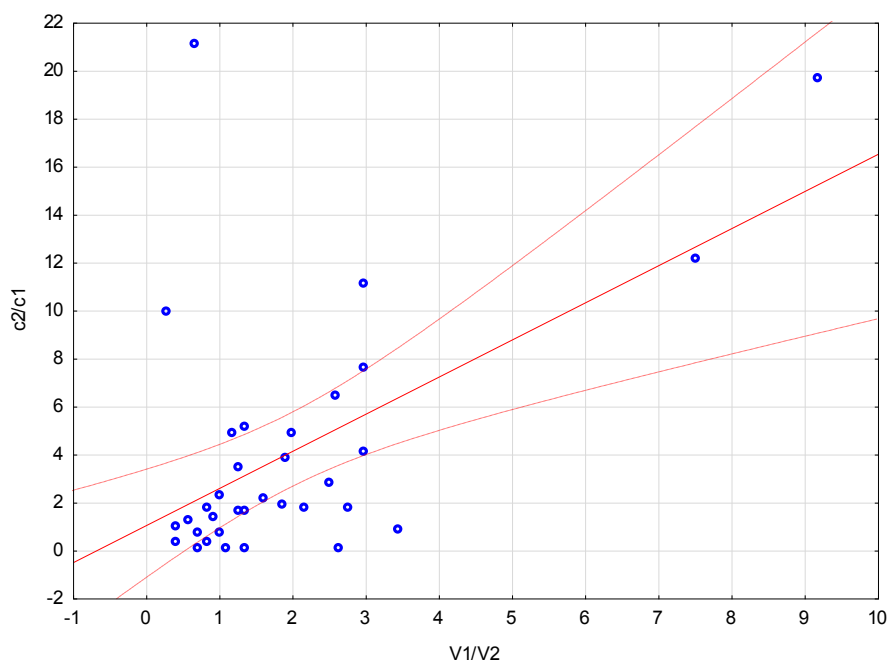
**Graf 8: Krabicový graf porovnávající koncentraci první (c1) a druhé (c2) ranní moči u kontrol a pacientů s rakovinou močového měchýře**  
*Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil.*

Nejvyšší koncentrace cfDNA v moči byly u pacientů, kteří vymočili velmi malé objemy moči (Tabulka 17).

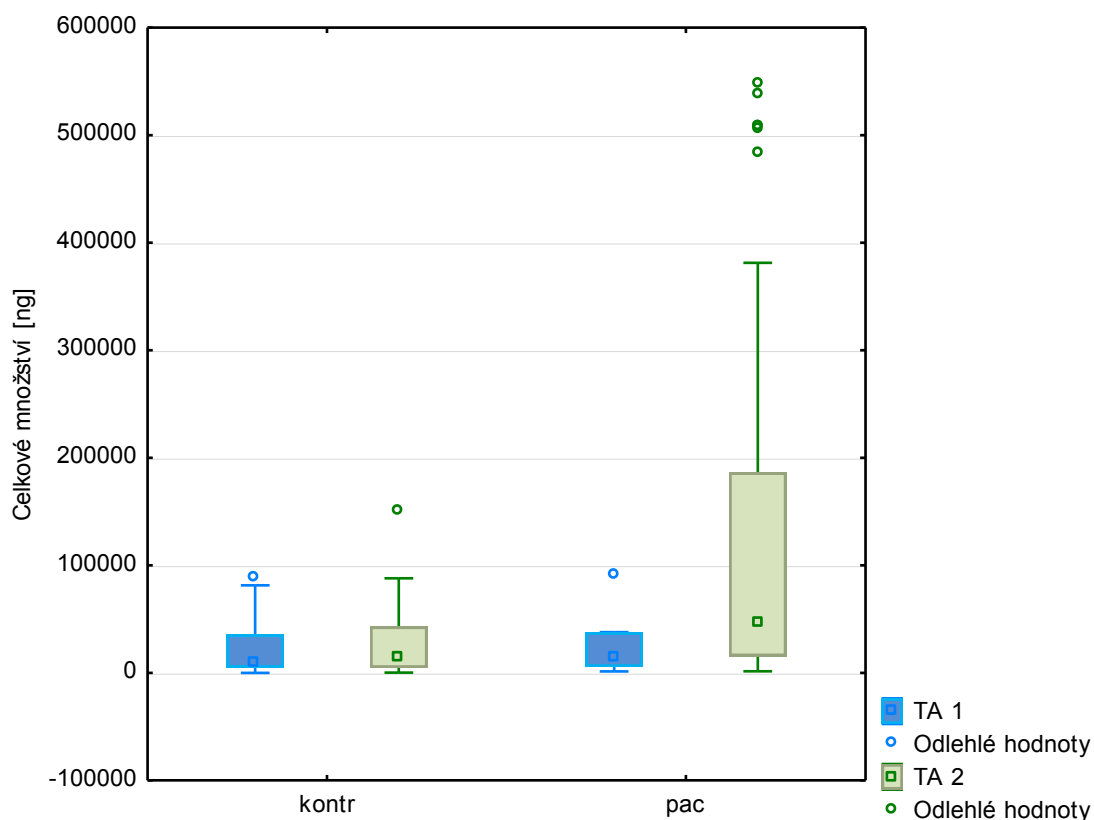
Tabulka 17: Rozdíly koncentrací močové cfDNA 2. ranní moči u pacientů s rakovinou močového měchýře v závislosti na objemu moči

	N	25. percentil [ng/ml]	Medián [ng/ml]	75. percentil [ng/ml]
Pacienti s nízkým objemem (<100 ml)	22	296	1082	4244
Všichni pacienti	66	94	314	2442
Pacienti s vysokým objemem (>190 ml)	21	61	201	499

Za předpokladu, že se do moči za daný čas uvolní stejné množství cfDNA, bylo dedukováno, že čím vyšší je vymočené množství, tím nižší bude koncentrace cfDNA ve získané moči. Tato dedukce se ukázala být pravdivá korelací  $\frac{c_1}{c_2}$  versus  $\frac{V_2}{V_1}$  ( $r=0,550219$ ) (Graf 9) a proto se jako správný přístup jeví výpočet celkového množství cfDNA v moči (TA) (Graf 10), a nikoli samotná koncentrace cfDNA.



Graf 9: Korelace  $\frac{c_1}{c_2}$  versus  $\frac{V_2}{V_1}$  ( $r=0,550219$ )



**Graf 10: Krabicový graf porovnávající celkové množství první (TA 1) a druhé (TA 2) ranní moči u kontrol a pacientů s rakovinou močového měchýře**  
Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil, kolečka znázorňují odlehlé hodnoty.

Druhá ranní moč měla signifikantně vyšší koncentraci močové cfDNA ( $p=0,044$ ) a zároveň měla nižší objem ( $p=0,002$ ). Celkové množství cfDNA u první i druhé ranní moči bylo stejné ( $p=1,0$ ). Za použití regresní analýzy byl testován vztah mezi objemem a koncentrací. Regrese byla provedena rovnicí  $y = a + b \times \log(x)$  kde  $x = \frac{V_2}{V_1}$ ,  $y = \frac{c_1}{c_2}$  (založeno na předpokladu, že  $c_1 \times V_1 \approx c_2 \times V_2$ ). Na základě tohoto výpočtu byla zjištěna logaritmická závislost mezi objemem a koncentrací ( $p=0,0001$ ). Proto bylo celkové množství (TA) zahrnuto do kvantifikace močové cfDNA.

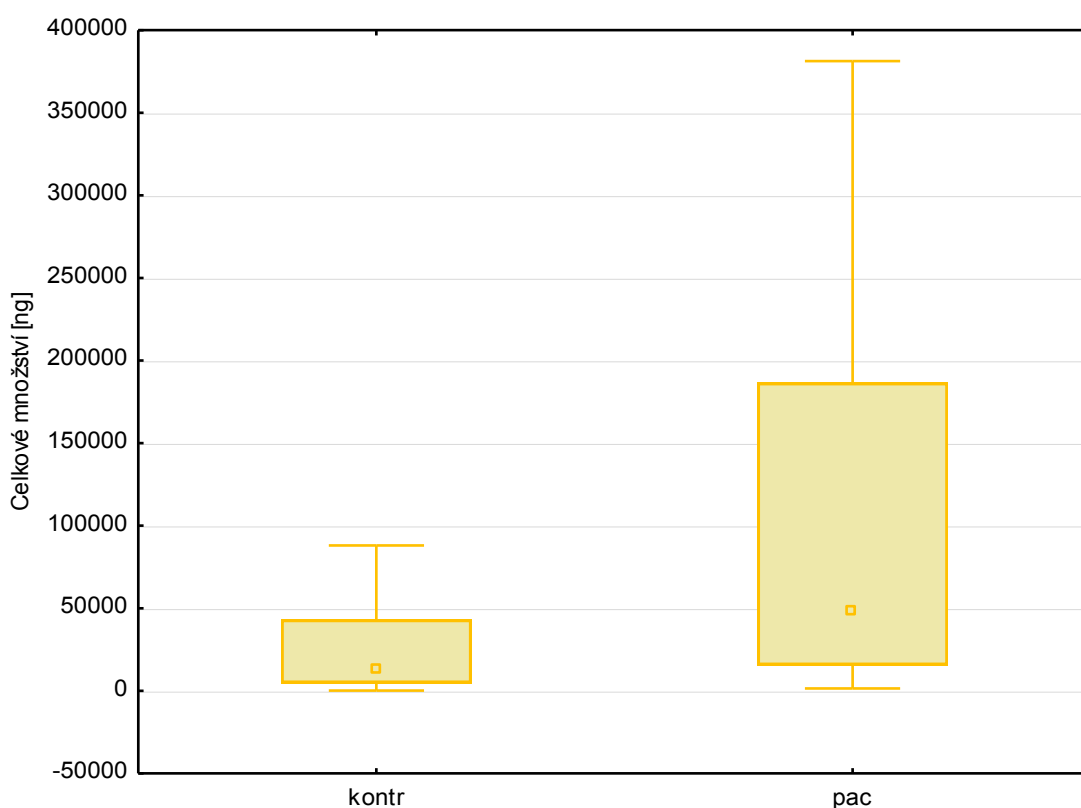
Vzhledem k tomu, že celkové množství cfDNA je stejné u první i druhé ranní moči, a že první ranní moč při izolaci cfDNA ucpávala izolační kolonky (*QIAamp Mini column*) a tím

neúměrně prodlužovala dobu izolace, byla druhá ranní moč vybrána jako vhodnější k analýze.

#### V.2.2 Porovnání celkového množství močové cfDNA u pacientů a kontrol

Celkové množství močové cfDNA bylo stanoveno v druhé ranní moči u 100 jedinců (23 zdravých dobrovolníků, 11 pacientů s benigními urologickými onemocněními a 66 pacientů s rakovinou močového měchýře) (Tabulka 4). Mezi jednotlivými skupinami nebyly rozdíly ve věku ani pohlaví jedinců ( $p > 0,05$ ).

Při porovnání celkového množství cfDNA u všech kontrol a pacientů Mann-Whitneyovým testem vyšel statisticky signifikantní rozdíl, pacienti měli vyšší množství cfDNA v supernatantu moči ( $p = 0,0002$ ) (Graf 11).

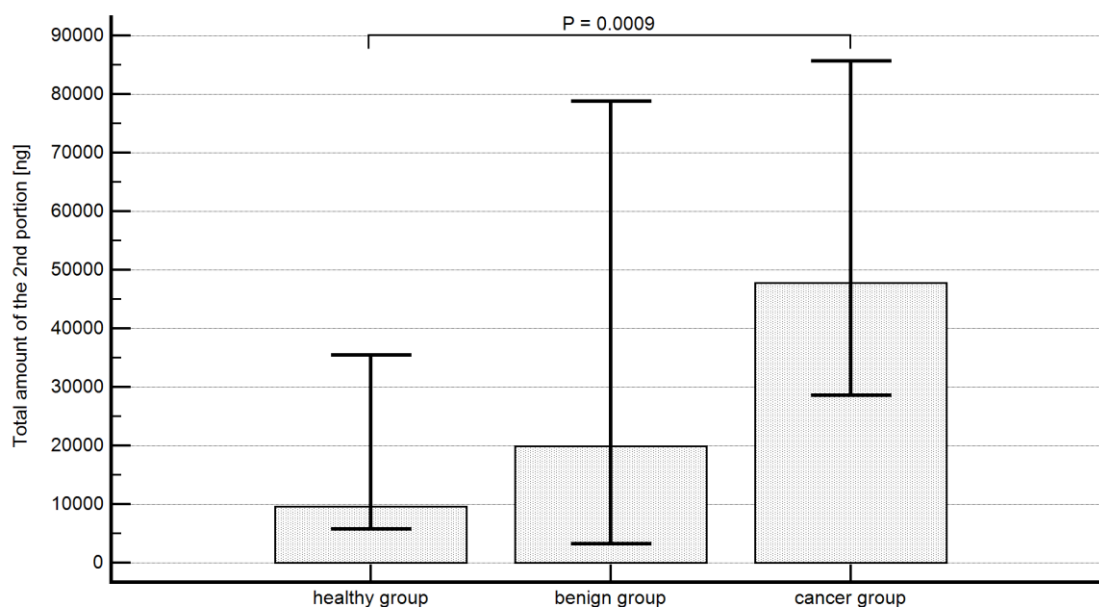


*Graf 11: Krabicový graf porovnávající celkové množství cfDNA v 2. ranní moči u kontrol a pacientů*

*Medián je označen čtverečkem, obdélník znázorňuje 25. a 75. percentil.*

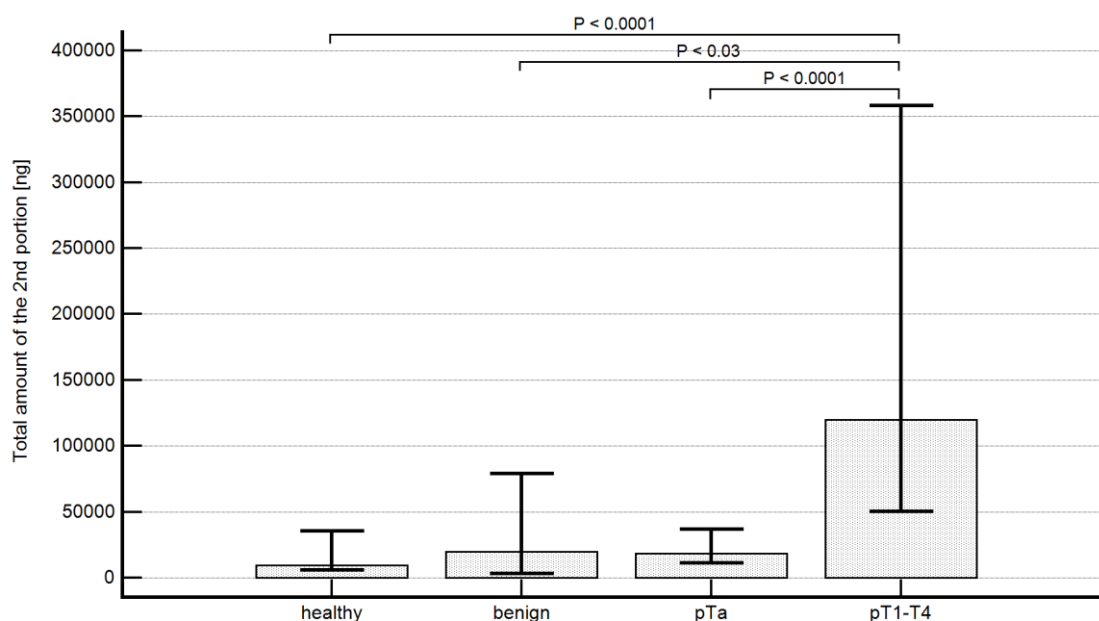


Kontroly byly následně rozděleny na podskupiny „zdraví“ a „benigní“, pacienti zůstali jako jedna skupina, a byla provedena Kruskal-Wallisova ANOVA ( $p=0,00085$ ). Při post hoc analýze byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ( $p=0,0009$ ) v celkovém množství cfDNA mezi „zdravými“ a pacienty (Graf 12). Překvapivě mezi pacienty a „benigní“ skupinou nebyl rozdíl statisticky signifikantní ( $p=0,3$ ). Na základě tohoto zjištění byla skupina pacienti rozdělena na podskupiny na pTa s nižšími stádii a pT1-4 s vyššími stádii rakoviny močového měchýře a opět byla provedena post hoc analýza Kruskal-Wallisovým testem s výsledkem ( $p=0,000001$ ). Signifikantní rozdíly v celkovém množství cfDNA byly mezi oběma skupinami kontrol a podskupinou pT1-4 (Graf 13). Podskupina pTa se nelišila od žádné z kontrolních podskupin, ale lišila se od podskupiny pT1-4 s pokročilejšími stádii rakoviny.



**Graf 12: Krabicový graf porovnávající celkové množství cfDNA v 2. ranní moči ve skupinách „zdraví“, „benigní“ a „pacienti“**

*Převzato z původního článku (Brisuda, Pazourkova et al. 2015)*



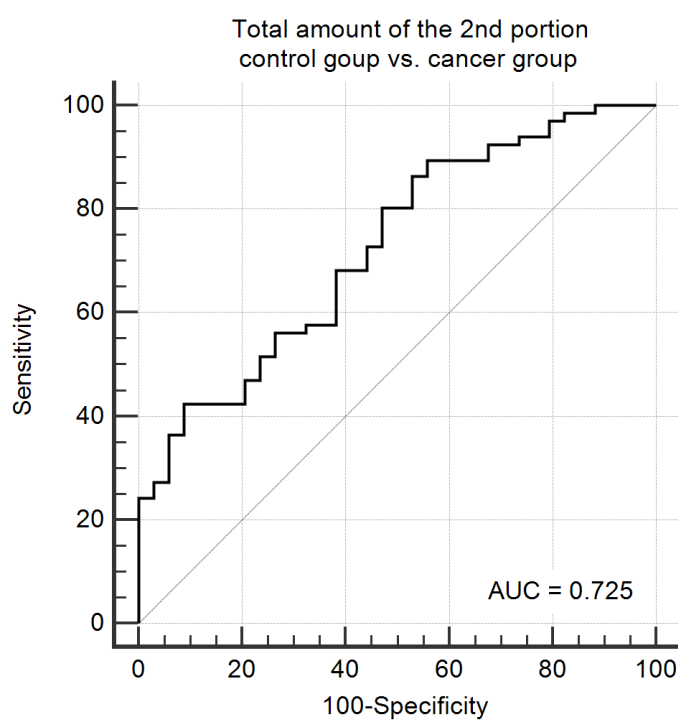
**Graf 13: Krabicový graf porovnávající celkové množství cfDNA v 2. ranní moči ve skupinách „zdraví“, „benigní“ a pacienti s podskupinami pTa a pT1-4**

*Převzato z původního článku (Brisuda, Pazourkova et al. 2015)*

K prokázání potenciálu celkového množství cfDNA v 2. ranní moči rozpoznat pacienty s rakovinou močového měchýře od jedinců bez rakoviny byly spočteny senzitivita a specifita s příslušnými *cut-off* hodnotami (Tabulka 18) a sestavena *receiver operating characteristic* (ROC) křivka (Graf 14). Pro nejlepší senzitivitu a specifitu (42,4 % a 91,2 %) byla plocha pod ROC křivkou 0,725. Při *cut-off* hodnotě 65 055 ng byla pozitivní prediktivní hodnota 90 % a negativní prediktivní hodnota 45 %.

Tabulka 18: *Senzitivita a specifita s cut-off hodnotami celkového množství cfDNA v 2. ranní moči*

Senzitivita [%]	Specifita [%]	Cut-off hodnota [ng]
36,4	94,1	87 991
47,0	79,4	52 800
56,1	73,5	39 124
68,2	61,8	19 866
80,3	52,9	13 601
89,4	44,1	8 257



Graf 14: *ROC křivka kontrol a pacientů*, Youden index  $J=0,336$ , cut-off 65 055 ng, senzitivita 42,4 %, specifita 91,2 %

Převzato z původního článku (Brisuda, Pazourkova et al. 2015)

Schopnost celkového množství cfDNA v moči detekovat pacienty s pTa nádorem měla senzitivitu 12 % a specifitu 91,2 %. U vyšších stádií pT1-4 byla senzitivita 62,5 % a specifita 91,2 %. Pokud byl brán v potaz grading, LG tumory byly detekovány se

senzitivitou 20,7 % a specificitou 91,2 %, u HG tumorů dosáhla schopnost celkového množství cfDNA odlišit pacienty s nádorem močového měchýře od kontrol hodnot senzitivitu 59,5 % a specificitu 91,2 %.

Když vezmeme v úvahu, že cytologie v naší studii dosáhla při diagnostice LG nádorů senzitivity 38,5 % a specificity 92,6 %, odpovídající hodnoty pro diagnostiku HG tumorů byly 86,5 % a 92,6 %, tyto výsledky jsou minimálně srovnatelné.

Použití celkového množství cfDNA v 2. ranní moči společně s cytologií ale nevede ke zvýšení senzitivity. Pouze jeden pacient s LG nádorem byl zachycen navíc oproti cytologii, ale na úkor tří falešně pozitivních případů, tím došlo ke zvýšení senzitivity na 42,3 %, ale snížení specificity na 81,5 %. Podobně je tomu u HG nádorů, kde celkové množství cfDNA zachytilo dva pacienty, které nezachytila cytologie, což zvýšilo senzitivitu na 91,9 %. Proto kombinace těchto dvou přístupů nezlepší diagnostickou schopnost.

## VI Diskuze

Rakovina močového měchýře je zhoubný nádor, který i při úspěšné léčbě velmi často recidivuje, a proto je potřeba pacienty po léčbě doživotně sledovat (Botteman, Pashos et al. 2003). Vzhledem k tomu, že nyní používanou diagnostickou metodou je cystoskopie, nepříjemný invazivní výkon, který s sebou nese i určitá zdravotní rizika, je velkým přáním všech pacientů jednoduché, ale spolehlivé neinvazivní vyšetření. Jako ideální materiál se proto nabízí moč – je dostupná opravdu neinvazivně a omývá sliznici močového měchýře i s případným nádorem.

### VI.1 miRNA v moči

Jako biomarker byly v této studii vybrány miRNA, které se vyskytují ve všech tělních tekutinách (Weber, Baxter et al. 2010) a jsou stabilní (Cortez, Bueso-Ramos et al. 2011).

Ve studiích, které se zabývají miRNA, ovšem nejsou ustálené a všeobecně uznávané endokontroly pro normalizaci výsledků v různých tkáních a tělních tekutinách (Tabulka 1), ale normalizace dat je podstatnou součástí výzkumu a může velmi změnit výsledky (Lombardi 2018).

S ohledem na výsledky a doporučení několika studií (Weber, Baxter et al. 2010, Lamba, Ghodke-Puranik et al. 2014, Ratert, Meyer et al. 2014) nebyla použita RNU6 nebo RNU6B, protože to nejsou miRNA, ale malé jaderné RNA, které nejsou vhodné pro normalizaci v tkáních, natož pak v tělních tekutinách. Vzhledem k tomu, že nebyla nalezena žádná studie doporučující vhodné endokontroly pro supernatant moči, bylo rozhodnuto, že endokontroly budou vybrány pomocí algoritmu geNorm, který je uznávaným nástrojem ke hledání vhodných normalizačních miRNA (Jarry, Schadendorf et al. 2014). Algoritmus navrhl tři miRNA: miR-191, miR-28-3p a miR-200b.

K získání pilotních dat v první části studie byly použity array karty, výsledky byly následně ověřovány assayemi pro jednotlivé miRNA v druhé a třetí fázi studie. V první a druhé fázi byl použit stejný soubor jedinců a ve třetí fázi byly výsledky validovány na novém nezávislém souboru, jehož velikost byla určena power analýzou.

Výsledkem celé studie bylo nalezení pěti miRNA, které měly signifikantně sníženou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře oproti kontrolám (miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p).

Naše výsledky jsou v částečné shodě s předchozími i pozdějšími vědeckými články (Tabulka 1). Například miR-125b měla sníženou expresi u pacientů s rakovinou močového měchýře ve 3 dalších studiích: v celé moči (Snowdon, Boag et al. 2013), v sedimentu (Mengual, Lozano et al. 2013) i v supernatantu (Zhang, Lau et al. 2014).

miR-204 měla sníženou expresi u pacientů v celé moči (Hofbauer, de Martino et al. 2018), močovém sedimentu (Mengual, Lozano et al. 2013), i v buněčných liniích rakoviny močového měchýře (Yoshino, Chiyomaru et al. 2011, Pignot, Cizeron-Clairac et al. 2013), ale v supernatantu moči její hladiny nebyly dříve prokázány.

Doposud provedené studie poskytují nekonzistentní výsledky ohledně exprese miR-30b u pacientů s rakovinou močového měchýře. Wszolek a kol. našli sníženou expresi miR-30b ve tkáni nádoru u MIBC ve srovnání s NMIBC (Wszolek, Rieger-Christ et al. 2011). Ale v dalších studiích stejného kolektivu popsali Mahdavinezhad a kol. zvýšenou expresi miR-30b v nádorové tkáni (Mahdavinezhad, Mousavi-Bahar et al. 2015 A, Mahdavinezhad, Mousavi-Bahar et al. 2015 B). Wei s kolegy naopak žádnou změnu exprese miR-30b v celé moči neobjevili (Wei, Bing et al. 2015).

Žádná studie dodnes také neoznačila miR-532-3p za významně deregulovanou u pacientů s rakovinou močového měchýře. Ale je několik studií, které spojují její deregulaci v tkáních (Zhao, Liu et al. 2013, Han, Wang et al. 2019) nebo plazmě (Kanaan, Roberts et al. 2013, Benson, Skaar et al. 2015) pacientů s jinými onkologickými onemocněními.

S našimi výsledky druhé fáze se shoduje také několik dalších studií. miR-93 měla zvýšenou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře ve čtyřech studiích (De Long, Sullivan et al. 2015, Urquidi, Netherton et al. 2016, Allione, Pardini et al. 2018, Juracek, Peltanova et al. 2018) a v extracelulárních vezikulách (De Long, Sullivan et al. 2015) a let-7c měla sníženou expresi v celé moči i supernatantu

pacientů (Hofbauer, de Martino et al. 2018, Pardini, Cordero et al. 2018), také ve zjištění zvýšení exprese miR-199a-3p u pacientů s rakovinou močového měchýře byla shoda s Urquidi a kol. (Urquidi, Netherton et al. 2016).

Velmi zajímavá se zdá být miR-16, která měla ve druhé fázi naší studie zvýšenou expresi, s čímž se shodnou výsledky Sapreho a kol., kteří ji našli v celé moči (Sapre, Macintyre et al. 2016). Větší problém je použití miR-16 jako endokontroly pro celou moč v článku (Puerta-Gil, García-Baquero et al. 2012), Puerta-Gil odůvodňuje její použití tím, že její exprese je neměnná v nádorové i nenádorové tkáni, ale nevysvětlují její použití na celé moči, kde buněk není velké množství.

Také miR-191, která je v naší studii používána jako endokontrola, měla zvýšenou expresi v supernatantu moči u pacientů s rakovinou močového měchýře podle studií Juráčka a kol. (Juracek, Peltanova et al. 2018, Juráček, Staník et al. 2018), kteří prováděli normalizaci na absolutní koncentraci.

I miR-200b, další naše endokontrola, měla podle De Long a kol. zvýšenou expresi v extracelulárních vezikulách (De Long, Sullivan et al. 2015), v článku ovšem nemají zmíněný způsob normalizace.

A jak již bylo zmíněno, způsob normalizace velmi ovlivní výsledky.

Vzhledem k tomu, že rakovina močového měchýře je častější u mužů (Abdollah, Gandaglia et al. 2013), byl zkoumán rozdíl exprese miRNA mezi ženami a muži, ale nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v expresi miRNA zkoumaných v naší studii.

Pouze částečné shody mezi jednotlivými studiemi mohou být způsobeny metodologickými přístupy různých výzkumných týmů a využitím různých způsobů normalizace (Jarry, Schadendorf et al. 2014). Vzhledem k této variabilitě metod mohou shodné výsledky mezi studiemi představovat nálezy se skutečnou biologickou významností. Naše další bádání se proto zaměřilo na regulační síť miR-125b a miR-99a a lepší porozumění jejich rolí v karcinogenezi močového měchýře.

Snížená exprese miR-125b a miR-99a byla nalezena nejen v moči, ale i v nádorové tkáni rakoviny močového měchýře (Lin, Dong et al. 2009, Zhang, Lau et al. 2014, Tang, Zhou et al. 2015).

Působení miR-125b bylo zkoumáno i na transfekčních experimentech na buněčných liniích rakoviny močového měchýře. Při transfekci miR-125b do buněčné linie byl růst buněk signifikantně inhibován ve srovnání s kontrolou. Autoři také našli potenciální cíl miR-125b – onkogen E2F3, jehož translace byla inhibována transfekovanou miR-125b (Huang, Luo et al. 2011).

G. Feng a kol. našli snížení exprese miR-99a v buněčných liniích rakoviny močového měchýře, v nádorové tkáni i v plazmě pacientů s rakovinou močového měchýře (Feng, Kang et al. 2014). Zhang a kol. (Zhang, Lau et al. 2014) také našli v supernatantu moči pacientů snížení exprese miR-99a. Y.G. Feng a kol. zjistili, že umělá miR-99a (miRNA *mimics*<sup>5</sup>) dokáže inhibovat dělení buněk v buněčné linii rakoviny močového měchýře a zároveň zvyšovat senzitivitu buněk k chemoterapii (Feng, Liu et al. 2016).

Geny pro obě výše diskutované miRNA se sníženou expresí u pacientů s rakovinou močového měchýře (miR-125b i miR-99a) jsou v klastru na chromozomu 21 (Calin, Sevignani et al. 2004). V naší studii byla nalezena korelace jejich expresí ( $r=0,89$ ,  $p<0,0001$ ) (Graf 4). Bioinformatická analýza validovaných cílů těchto dvou miRNA odhalila skupiny genů zahrnujících dráhy významné při karcinogenezi rakoviny močového měchýře (Tabulka 16). Nález 52 genů zahrnujících „Odpověď na organické látky“ a 14 genů zahrnutých v „Odpovědi na cyklické organické látky“ může být velmi zajímavý zvláště s ohledem na kouření jako rizikový faktor při vzniku rakoviny močového měchýře (Besaratnia and Tommasi 2013). Podle těchto zjištění byl proveden pokus o interpretaci našich výsledků s ohledem na vliv kouření jedinců na vznik rakoviny

---

<sup>5</sup> miRNA mimics jsou uměle vytvořené molekuly obsahující uměle vytvořené dvouvláknové miRNA podobné fragmenty, které obsahují sekvenci, která je komplementární k 3' UTR sekvenci mRNA. miRNA mimics po nasednutí na 3' UTR blokuje translaci dané mRNA

Rupaimoole, R. and F. J. Slack (2017). "MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases." *Nature reviews Drug discovery* **16**(3): 203.



močového měchýře, ale po kritické revizi velikosti souborů (nekuřáci, bývalí kuřáci a kuřáci) bylo zřejmé, že soubory nejsou vhodné pro tento typ analýzy kvůli jejich limitované velikosti a klinické heterogenitě.

Při porovnání plochy pod křivkou, senzitivit a specificit (Tabulka 18) s testy založenými na cytologii se ukazuje, že analýza vybraných miRNA v supernatantu moči by mohla obohatit portfolio neinvazivních detekčních testů rakoviny močového měchýře. Cytologie je dnes jediným neinvazivním diagnostickým testem rutinně používaným v klinické praxi, její diagnostické schopnosti jsou dobré u HG pacientů (senzitivita 86,5 % a specifita 92,6 %), ale horší u LG pacientů (senzitivita 38,5 % a specifita 92,6 %) (Brisuda, Pazourkova et al. 2015). Proto by kombinace cytologie a vybraných miRNA se změněnou expresí v supernatantu moči mohla přinést zlepšení diagnostiky.

Zajímavý pohled do karcinogeneze může poskytnout také studium exozomů, jejichž obsah se poslední také dostává do hledáčku vědců, což je patrné i v aktuální literatuře (viz Tabulka 1). Exozomy totiž obsahují jiné množství a poměry miRNA, než obsahuje plazma nebo sérum (Cheng, Sharples et al. 2014) a dá se předpokládat, že tomu bude stejně i v jiných tělních tekutinách. To může být způsobeno tím, že obsah exozomů je chráněn před degradací (Rak 2013). Podle Streeta a kol. mohou být exozomy vhodnějším zdrojem biomarkerů než celá moč (Street, Koritzinsky et al. 2017).

Exozomy jsou extracelulární vezikuly, které jsou uvolňovány z buněk (Edgar 2016). Poprvé byly objeveny v roce 1983 Hardingem a kol. (Harding, Heuser et al. 1983) a pojmenovány až v roce 1987 Johnstonem a kol. (Johnstone, Adam et al. 1987). Exozomy hrají roli v mezibuněčné komunikaci, tím, že přenášejí proteiny, lipidy miRNA, mRNA i fragmenty DNA mezi jednotlivými buňkami. Při práci s exozomy je velkou výzvou jejich identifikace, protože neexistuje jejich specifický biologický marker. Velmi často jsou používány CD63 a CD81 (*cluster of differentiation* – diferenciační skupina) nebo jejich velikost (30-100 nm) a tvar pod elektronovým mikroskopem (Edgar 2016). Zároveň je jejich izolace výzvou, protože ultracentrifugace je náročná a komerční kity nejsou zatím úplně uznávané. Proto analýza obsahu exozomů nebyla zahrnuta v naší studii.

Existuje online databáze, která katalogizuje proteiny, lipidy a RNA nalezené v exozomech: <http://www.exocarta.org/> (Keerthikumar, Chisanga et al. 2016).

Kromě diagnostických účelů bude v budoucnosti pravděpodobně možné miRNA používat i k léčbě. Slibné se zdají být výsledky umělé miR-99a, která snižuje schopnost proliferace buněčných linií nádoru močového měchýře (Feng, Liu et al. 2016). V posledních letech bylo dokonce patentováno několik látek založených na použití miRNA, jejich shrnutí je v rešeršním článku Chakraborty a kol. (Chakraborty, Sharma et al. 2017).

Miravirsen byl první vyvíjenou léčivou látkou zacílenou na miRNA, konkrétně anti-miR-122 (van der Ree, van der Meer et al. 2014). Miravirsen byl testován k léčbě infekcí virem hepatitidy C, ale jeho vývoj byl zastaven a nahrazen novým oligonukleotidem (Van der Ree, Van Der Meer et al. 2016), nazývaným RG-101, který ukončil druhou fázi klinického testování (<https://globalclinicaltrialdata.com/>). Další takovou látkou je MRX34, která obsahuje umělou miR-34a, která slouží jako tumor supresor. MRX34 úspěšně ukončila první fázi klinického testování (Beg, Brenner et al. 2017). Dá se předpokládat, že budou následovat i další.

## VI.2 cfDNA v moči

Pro další studii byla jako neinvazivní biomarker vybrána cfDNA, která je v moči velmi dobře dostupná a stabilní (Cannas, Kalunga et al. 2009). U urologických malignit bylo zjištěno, že cfDNA z moči má lepší diagnostickou schopnost než cfDNA v plazmě (Goessl, Müller et al. 2002), proto byly od pacientů sbírány vzorky moči a nikoli plazmy.

Několik studií zkoumalo cfDNA v moči jako potenciální marker rakoviny močového měchýře (Chang, Tsui et al. 2007, Casadio, Calistri et al. 2013). Ale žádná ze studií se podrobně nezabývala správnou metodologií. Proto byla první část této studie věnována výběru vhodné metodologie zpracování cfDNA v supernatantu moči.

V první části studie, kdy byl vybírán vhodný čas odběru moči, byla odebrána první a druhá ranní moč celkem 27 jedinců (11 zdravým dobrovolníkům, 6 kontrolám

s benigním urologickým onemocněním a 10 pacientům s rakovinou močového měchýře). Do druhé části studie, kde se zkoumal rozdíl celkového množství cfDNA v supernatantu moči pacientů a kontrol, byla odebrána pouze druhá ranní moč od dalších 73 jedinců. Celkem byla odebrána moč 100 jedincům (23 zdravým dobrovolníkům, 11 pacientům s benigními urologickými onemocněními a 66 pacientům s rakovinou močového měchýře) (Tabulka 4).

Výsledkem první části studie byl výběr druhé ranní moči jako vhodnější pro stanovení obsahu cfDNA v moči. Toto rozhodnutí bylo učiněno na základě toho, že celkové množství cfDNA bylo stejné u první i druhé ranní moči, a že první ranní moč při izolaci cfDNA ucpávala izolační kolonky (*QIAamp Mini column*) a tím prodlužovala dobu izolace.

Zároveň byla řešena otázka, zda používat koncentraci cfDNA a normalizovat ji například na kreatinin, který je používán ve většině biochemických testů a který se liší v závislosti na objemu moči (Szarvas, Kovalszky et al. 2007). Tato metoda normalizace byla použita pouze v jedné studii (Chang, Tsui et al. 2007). Koncentrace kreatininu není závislá jen na příjmu tekutin a tím pádem na objemu moči, ale i na metabolismu konkrétního jedince (Dyer, Greenland et al. 2004). Z toho důvodu nebyl kreatinin vybrán jako vhodný faktor k normalizaci koncentrace cfDNA.

Hladinu cfDNA může ovlivnit i počet, velikost nádorů a jejich grade, ale je v podstatě nemožné změřit plochu všech nádorů v močovém měchýři.

Za předpokladu, že se z nádoru do moči za daný čas uvolní určité množství cfDNA, bylo dedukováno, že čím vyšší je vymočené množství v druhé ranní moči, tím nižší bude koncentrace cfDNA v získané moči. Tato dedukce se potvrdila korelací  $\frac{c1}{c2}$  versus  $\frac{V2}{V1}$  ( $r=0,550219$ ) (Graf 9), a proto byl vybrán výpočet celkového množství cfDNA v moči.

V druhé části studie bylo při použití celkového množství cfDNA stanovovaného v druhé ranní moči možné rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol ( $p=0,0009$ ) (Graf 11). Při rozdělení pacientů na nižší a vyšší stádia se skupina „benigní“ lišila pouze od pacientů s vyššími stádii (pT1-4), ale ne od pacientů s nižšími stádii (pTa) (Graf 13).

Tyto výsledky jsou ve shodě s předchozími studiemi. Zancan a kol. ve své studii nebyli schopni rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol, ale pacienti v jejich souboru byly převážně ve stadiu pTa (Zancan, Galdi et al. 2009). Chang a kol. naproti tomu do studie zahrnuli pacienty se všemi stádii rakoviny močového měchýře a díky tomu byli schopni rozlišit mezi pacienty a zdravými kontrolami, ale nenašli rozdíly mezi skupinami pacientů s různými stádii (pTa, pT1 a pT2-3) (Chang, Tsui et al. 2007). V naší studii bylo možné rozlišit pacienty s pTa od pacientů s vyššími stádii (pT1-4), rozdělení pacientů na menší skupiny nebylo proveditelné kvůli nižšímu počtu pacientů.

Žádná ze zmíněných studií nezmiňovala, jestli kontroly byli zdraví jedinci nebo pacienti s benigním urologickým onemocněním. To je velmi podstatné, protože v klinické praxi každý pacient, který přijde na oddělení urologie, má nějaký urologický problém a pokud je vyloučena rakovina, stejně má pacient nějaké benigní urologické onemocnění.

Zdraví dobrovolníci, tvořící v naší studii většinu kontrol, jsou především starší pacienti hospitalizovaní na jiných odděleních nemocnic, což může způsobit nadhodnocení specifity testu. V souboru pacientů tvoří pacienti s pTa největší podskupinu, většina z nich má LG nádor (Tabulka 4). V neselektované populaci pacientů s rakovinou močového měchýře převažují právě jedinci s pTa LG nádory a z tohoto důvodu se dá očekávat, že vypočtené senzitivity a specifity budou v reálném prostředí opět horší, protože ve studii jsou zahrnuti i pacienti s vyššími stádii. Přitom nezachycení pacientů s pTa LG při primární diagnóze je velký problém. Na druhou stranu tím, že tito pacienti mají nízké riziko progresu k invazivním nádorům, z klinického hlediska není dopad tak závažný. Proto by při negativním výsledku mohl být prodloužen interval mezi cystoskopiemi.

ROC analýza v naší studii poskytla pouze mírnou přesnost predikce s poměrně dobrou specificitou 91,5 % a nízkou senzitivitou 42,4 % při zvolených *cut-off* hodnotách (Graf 14, tabulka 18). Nízká hodnota senzitivity je způsobena převažujícím počtem pacientů se stádiem pTa, kde nebyl zjištěn rozdíl celkového množství cfDNA v moči oproti kontrolám (Graf 13). Vyšší celkové množství cfDNA bylo u pacientů s vyššími stádii

pT1-4, kde test dosáhl senzitivity 62,5 % a u HG tumorů všech stádií, kde byla senzitivita 59,5 %.

Při kombinaci analýzy celkového množství cfDNA v moči s cytologií došlo pouze k nepatrnému zvýšení specifity, proto můžeme soudit, že analýzy celkového množství cfDNA v moči a cytologie moči mají stejné diagnostické výsledky a jejich kombinace nepřináší zlepšení.

Jako metodologický podklad byl použit výběr druhé ranní moči jako lepšího zdroje cfDNA ve studii Streleckiene a kol. Ti porovnávali komerční kity na izolaci cfDNA a zároveň hledali interindividuální rozdíly v hladině cfDNA a rozdíly její hladiny mezi pohlavími (Streleckiene, Reid et al. 2018).

I tato studie měla svá omezení. Hladiny cfDNA mohou být ovlivněny mnoha faktory: počtem a velikostí povrchu tumorů, jejich gradingem a stádií, přítomností infekce ve vylučovacím ústrojí, leukocyturií a dalšími. Velikost povrchu nádoru je velmi těžko hodnotitelná vzhledem k subjektivnímu hodnocení cystoskopie, proto tento údaj nemohl být ve studii zahrnut. Ze statistického pohledu bylo hodnoceno poměrně málo jedinců v první části studie, kdy se porovnávaly první a druhé ranní moči. Stejně tak malé množství jedinců mohlo být problémem při analýzách podskupin, přestože všechny post hoc analýzy daly signifikantní výsledky.

## VII Závěr

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny a na položené otázky se podařilo najít následující odpovědi:

1. Existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v moči pacientů s nádorem močového měchýře, které jednoznačně odlišují tyto pacienty od osob bez tohoto nádoru?
  - Ano, existují klinicky využitelné rozdíly v obsahu miRNA v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře a kontrol. Výsledkem první zmiňované studie bylo nalezení pěti miRNA v supernatantu moči, které odlišují pacienty od kontrol. Jedná se o miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p.
2. Lze najít rozdíly v expresi močových miRNA dovolující staging pacientů s nádory močového měchýře?
  - Ne, vybrané miRNA na použitém souboru pacientů nedovolují staging pacientů s rakovinou močového měchýře.
3. Lze hladiny volné DNA v moči využít pro diagnostiku a staging u pacientů s nádory močového měchýře?
  - Ano, hladiny volné DNA v moči lze použít pro diagnostiku i staging rakoviny močového měchýře. Při dodržení správné metodologie a využití celkového množství cfDNA v moči lze rozlišit pacienty s rakovinou močového měchýře od kontrol.

Výsledky studie miRNA v moči naznačují, že byla nalezena sada biologicky významných miRNA (miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30b a miR-532-3p), které mají sníženou expresi v supernatantu moči pacientů s rakovinou močového měchýře. Jejich senzitivity, specifity a plochy pod křivkou patří k nejlepším dodnes zveřejněným výsledkům. Především výsledky miR-125b naznačují její možné použití jako markeru pro neinvazivní diagnostiku rakoviny močového měchýře.

Výsledky naší studie jsou slibné, po zavedení uživatelsky přátelského laboratorního protokolu a validaci na velkém souboru pacientů a kontrol by mohl zmíněný přístup sloužit jako rutinní neinvazivní diagnostika rakoviny močového měchýře.

Ve studii cfDNA v moči bylo ukázáno, že metodologie analýzy cfDNA je důležitá, proto k potenciálním diagnostickým účelům rakoviny močového měchýře bylo vybráno stanovení celkového množství cfDNA v druhé ranní moči. Při dodržení metodologických postupů by bylo možné použít stanovení celkového množství cfDNA v moči jako novou strategii neinvazivní diagnostiky rakoviny močového měchýře, a to především v případech vyšších stádií nemoci.

Výsledky našich studií jsou slibné, po zavedení uživatelsky přátelského laboratorního protokolu a validaci na velkém souboru pacientů a kontrol by mohl zmíněný přístup sloužit jako rutinní neinvazivní diagnostika rakoviny močového měchýře.

## VII.1 Seznam publikací

### VII.1.1 Publikace které jsou podkladem dizertační práce:

Přiloženy k práci jako přílohy.

Článek *"MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection."* (Pospisilova, Pazourkova et al. 2016) je k datu 24.4.2019 citován v 10 publikacích (podle PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), což svědčí o aktuálnosti tématu.

Článek *"Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer."* (Brisuda, Pazourkova et al. 2015) je k datu 24.4.2019 citován v 5 publikacích (podle PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), což opět svědčí o aktuálnosti tématu.

### VII.1.2 Publikace, které nejsou podkladem dizertační práce:

*"The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients."* (Koutova, Sterbova et al. 2015)

*"Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs."* (Pazourkova, Pospisilova et al. 2016)

*"Differentially expressed miRNAs in trisomy 21 placentas."* (Svobodová, Korabečná et al. 2016)

*"The use of Human Inflammatory Response and Autoimmunity RT2 lncRNA PCR Array for plasma examination in breast cancer patients prior to therapy."* (Sterbova, Pazourkova et al. 2019)



## VIII Seznam zkratk:

ATP	adenozin trifosfát
bp	<i>base pair</i> – párů bazí
CD	<i>cluster of differentiation</i> – diferenciační skupina
cfDNA	<i>cell-free DNA</i> – volná DNA
CIS	<i>Carcinoma in situ</i> – ploché nádory
Ct	<i>Cycle of threshold</i> – cyklus prahu – počet cyklů PCR, než fluorescence překročí hladinu pozadí
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRBD	<i>double-strand RNA binding domain</i> – doména vázající dvouvláknovou RNA
HG	<i>high grade</i> – vysoký stupeň buněčné diferenciaci
hsa-	<i>homo sapiens sapiens</i> – označení druhu, z kterého je miRNA
kb	<i>kilobase</i> – tisíc bazí
kDa	kilo Dalton ( $1 \text{ Da} = 1,660 \times 10^{-27} \text{ kg}$ )
LG	<i>low grade</i> – nízký stupeň buněčné diferenciaci
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i> – dlouhá nekódující RNA
m <sup>7</sup> G	7-metyl guanozin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> – hlavní histokompatibilní komplex
MIBC	<i>muscle invasive bladder cancer</i> – rakovina močového měchýře invadující do svalů
miR-	označení zralé microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NIMBC	<i>non-muscle invasive bladder cancer</i> – rakovina močového měchýře neinvadující do svalů
nt	nukleotid(ů)

Pasha	<i>partner of Drosha</i>
PAZ	<i>PIWI Argonaute Zwillie</i> doména
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerázová řetězová reakce
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
pre-miRNA	<i>precursor for miRNA</i> – prekursor miRNA
pri-miRNA	<i>primary precursor for miRNA</i> – primární prekursor miRNA
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RNA	ribonukleová kyselina
TA	<i>total amount</i> – celkové množství
TNM	klasifikace T – tumor, N – lymfatické uzliny, M – metastázy
TRBP	<i>Trans Activating Response RNA-Binding Protein</i>
TURB	<i>Transurethral resection of bladder</i> – transuretrální resekce močového měchýře
UTR	<i>untranslated region</i> – netranslatovaná oblast

## IX Seznam literatury

- Abdollah, F., et al. (2013). "Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis." Cancer Epidemiology **37**(3): 219-225.
- Abolhassani, M., et al. (1994). "Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line HL-60." International Journal of Oncology **4**(2): 417-421.
- Adams, D., et al. (1997). "In vitro stimulation by tumour cell media of [3H]-thymidine incorporation by mouse spleen lymphocytes." Cell biochemistry and function **15**(2): 119-126.
- Alberry, M., et al. (2007). "Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast." Prenatal diagnosis **27**(5): 415-418.
- Allione, A., et al. (2018). "MMP23B expression and protein levels in blood and urine are associated with bladder cancer." Carcinogenesis **39**(10): 1254-1263.
- Altuvia, Y., et al. (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs." Nucleic acids research **33**(8): 2697-2706.
- Ambros, V., et al. (2003). "A uniform system for microRNA annotation." Rna **9**(3): 277-279.
- Andreu, Z., et al. (2017). "Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression." European Journal of Pharmaceutical Sciences **98**: 70-79.
- Anker, P., et al. (1999). "Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients." Cancer and Metastasis Reviews **18**(1): 65-73.
- Antonatos, D., et al. (2006). "Cell-Free DNA Levels as a Prognostic Marker in Acute Myocardial Infarction." Annals of the New York Academy of Sciences **1075**(1): 278-281.
- Armstrong, D. A., et al. (2015). "MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer." Molecular cancer **14**(1): 194.
- Atamaniuk, J., et al. (2004). "Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise." Clinical chemistry **50**(9): 1668-1670.
- Babjuk, M., et al. (2017). "EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2016." European urology **71**(3): 447-461.

Baev, V., et al. (2014). "Insight into small RNA abundance and expression in high-and low-temperature stress response using deep sequencing in Arabidopsis." Plant physiology and biochemistry **84**: 105-114.

Bagga, S., et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." Cell **122**(4): 553-563.

Beg, M. S., et al. (2017). "Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors." Investigational new drugs **35**(2): 180-188.

Benson, E. A., et al. (2015). "Carboplatin with decitabine therapy, in recurrent platinum resistant ovarian cancer, alters circulating miRNAs concentrations: a pilot study." PloS one **10**(10): e0141279.

Bernstein, E., et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.

Besaratinia, A. and S. Tommasi (2013). "Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions." Federation of American Societies for Experimental Biology Journal **27**(6): 2090-2100.

Borchert, G. M., et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nature structural & molecular biology **13**(12): 1097-1101.

Botezatu, I., et al. (2000). "Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism." Clinical chemistry **46**(8): 1078-1084.

Botteman, M. F., et al. (2003). "The health economics of bladder cancer." Pharmacoeconomics **21**(18): 1315-1330.

Brisuda, A., et al. (2015). "Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer." Urologie Internationalis.

Brouckaert, G., et al. (2004). "Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production." Molecular biology of the cell **15**(3): 1089-1100.

Bryzgunova, O. and P. Laktionov (2014). "Generation of blood circulating DNAs: sources, features of struction and circulation." Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry **8**(3): 203-219.

Bryzgunova, O. and P. Laktionov (2015). "Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential." Acta Naturae (англоязычная версия) **7**(3 (26)).

Budak, H., et al. (2015). "MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription." Briefings in functional genomics **15**(1): 65-71.

Burger, M., et al. (2013). "Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer." European urology **63**(2): 234-241.

Calin, G. A., et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(9): 2999-3004.

Cannas, A., et al. (2009). "Implications of storing urinary DNA from different populations for molecular analyses." PloS one **4**(9): e6985.

Casadio, V., et al. (2013). Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. Urologic Oncology. **31**(8):1744-50

Cortez, M. A., et al. (2011). "MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers." Nature reviews Clinical oncology **8**(8): 467.

De Long, J., et al. (2015). "A non-invasive miRNA based assay to detect bladder cancer in cell-free urine." American journal of translational research **7**(11): 2500.

Denli, A. M., et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231.

Desvignes, T., et al. (2015). "miRNA nomenclature: a view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants." Trends in Genetics **31**(11): 613-626.

Diehl, F., et al. (2005). "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America **102**(45): 16368-16373.

Dobbs, R. W., et al. (2014). "Incidence and clinical characteristics of lower urinary tract symptoms as a presenting symptom for patients with newly diagnosed bladder cancer." International Brazilian Journal of Urology **40**(2): 198-203.

Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes & Development **18**(5): 504-511.

Du, L., et al. (2017). "Cell-free microRNA expression signatures in urine serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer." Oncotarget **8**(25): 40832.

Duan, R., et al. (2017). "Combining protein and miRNA quantification for bladder cancer analysis." American Chemical Society: applied materials & interfaces **9**(28): 23420-23427.

Dušek, L., et al. (2015). "Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita,." Retrieved 22.2.2016, 2016.

Dweep, H., et al. (2014). miRWalk database for miRNA–target interactions. RNA Mapping, Springer: 289-305.

Dyer, A. R., et al. (2004). "Evaluation of measures of urinary albumin excretion in epidemiologic studies." American journal of epidemiology **160**(11): 1122-1131.

Eble, J. N. (2004). Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs, World Health Organization Classification of Tumours, 255-257

Edgar, J. R. (2016). "Q&A: What are exosomes, exactly?" BMC biology **14**(1): 46.

Eibe, F., et al. (2016). "The WEKA Workbench. Online Appendix for Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques." Morgan Kaufmann.

Eissa, S., et al. (2015 A). "Evaluation of urinary miRNA-96 as a potential biomarker for bladder cancer diagnosis." Medical Oncology **32**(1): 413.

Eissa, S., et al. (2015 B). "Integrative functional genetic-epigenetic approach for selecting genes as urine biomarkers for bladder cancer diagnosis." Tumor Biology **36**(12): 9545-9552.

Eissa, S., et al. (2015 C). "Evaluation of urinary microRNA panel in bladder cancer diagnosis: relation to bilharziasis." Translational research **6**: 731-73

Eissa, S., et al. (2019). Measurement of Urinary Level of a Specific Competing endogenous RNA network (FOS and RCAN mRNA/miR-324-5p, miR-4738-3p,/lncRNA miR-497-HG) Enables Diagnosis of Bladder Cancer. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, Elsevier **37**(4):292

Feng, Y.-G., et al. (2016). "miR-99a mimics improve the bladder cancer cell sensitivity to chemotherapeutic drugs: the mechanism research." Journal of Hainan Medical University **22**(24): 5-8.

Feng, Y., et al. (2014). "microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer." BMC Urology **14**(1): 50.

Ferlay, J., et al. (2014). GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

Filippov, V., et al. (2000). "A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes." Gene **245**(1): 213-221.

Fritzler, M. J. and E. K. Chan (2004). Antibodies to nonhistone antigens in systemic lupus erythematosus. Systemic Lupus Erythematosus (Fourth Edition), Elsevier: 349-376.

Gahan, P. (2006). "Circulating Dna." Annals of the New York Academy of Sciences **1075**(1): 21-33.

Ghorbanmehr, N., et al. (2018). "miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine—promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer." The Prostate **79**(1): 88-95.

Giacona, M. B., et al. (1998). "Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls." Pancreas **17**(1): 89-97.

Goessl, C., et al. (2002). "DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies." European urology **41**(6): 668-676.

Gormally, E., et al. (2006). "TP53 and KRAS2 mutations in plasma DNA of healthy subjects and subsequent cancer occurrence: a prospective study." Cancer research **66**(13): 6871-6876.

Gregory, R. I., et al. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." Cell **123**(4): 631-640.

- Grimson, A., et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Molecular cell **27**(1): 91-105.
- Grishok, A., et al. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing." Cell **106**(1): 23-34.
- Gryseels, B., et al. (2006). "Human schistosomiasis." The Lancet **368**(9541): 1106-1118.
- Hammond, S. M., et al. (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science **293**(5532): 1146-1150.
- Han, J., et al. (2019). "KIFC1 regulated by miR-532-3p promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma via gankyrin/AKT signaling." Oncogene **38**(3): 406.
- Hanke, M., et al. (2010). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer." Urologic Oncology **28**(6): 655-661.
- Harding, C., et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." The Journal of cell biology **97**(2): 329-339.
- He, H., et al. (2016). "ImmunoCyt test compared to cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis." Oncology letters **12**(1): 83-88.
- He, X., et al. (2017). "MicroRNA-186 regulates the invasion and metastasis of bladder cancer via vascular endothelial growth factor C." Experimental and therapeutic medicine **14**(4): 3253.
- Hofbauer, S. L., et al. (2018). A urinary microRNA (miR) signature for diagnosis of bladder cancer. Urologic Oncology **36**(12):531.
- Huang, D. W., et al. (2008). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nature Protocols **4**(1): 44-57.
- Huang, D. W., et al. (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." Nucleic Acids Research **37**(1): 1-13.



Huang, L., et al. (2011). "MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3." International Journal of Cancer **128**(8): 1758-1769.

Humphreys, D. T., et al. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function." Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America **102**(47): 16961-16966.

Hutvágner, G., et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

Hutvágner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060.

Chakraborty, C., et al. (2017). "Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine." Molecular Therapy-Nucleic Acids **8**: 132-143.

Chandrananda, D., et al. (2015). "High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA." BMC medical genomics **8**(1): 29.

Chang, H., et al. (2007). "Urinary cell-free DNA as a potential tumor marker for bladder cancer." The International journal of biological markers **22**(4): 287-294.

Chendrimada, T. P., et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-744.

Cheng, L., et al. (2014). "Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood." Journal of extracellular vesicles **3**(1): 23743.

Cheng, N., et al. (2017). "Specific and relative detection of urinary microRNA signatures in bladder cancer for point-of-care diagnostics." Chemical Communications **53**(30): 4222-4225.

Choi, J. J., et al. (2004). "Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro." Scandinavian journal of immunology **60**(1-2): 159-166.

Choi, J. J., et al. (2005). "The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells." Immunology **115**(1): 55-62.

Ingelmo-Torres, M., et al. (2017). "Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for non-muscle invasive bladder cancer." Oncotarget **8**(11): 18238.

- Jahr, S., et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." Cancer research **61**(4): 1659-1665.
- Jarry, J., et al. (2014). "The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions." Molecular Oncology **8**(4): 819-829.
- Johnstone, R. M., et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." Journal of Biological Chemistry **262**(19): 9412-9420.
- Jung, K., et al. (2010). "Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature." Clinica Chimica Acta **411**(21-22): 1611-1624.
- Juracek, J., et al. (2018 A). "Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer." Journal of cellular and molecular medicine **22**(3): 2033-2038.
- Juráček, J., et al. (2018 B). "Urinary MicroRNAs as Potential Biomarkers of Bladder Cancer." Klinická onkologie: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti **31**(Supplementum1): 155-157.
- Kanaan, Z., et al. (2013). "A plasma microRNA panel for detection of colorectal adenomas: a step toward more precise screening for colorectal cancer." Annals of surgery **258**(3): 400-408.
- Keerthikumar, S., et al. (2016). "ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo." Journal of molecular biology **428**(4): 688-692.
- Kent, M. S., et al. (2017). "MicroRNA profiling of dogs with transitional cell carcinoma of the bladder using blood and urine samples." BMC veterinary research **13**(1): 339.
- Kim, S. M., et al. (2013). "Cell-free microRNA-214 from urine as a biomarker for non-muscle-invasive bladder cancer." Korean Journal of Urology **54**(11): 791-796.
- Kinde, I., et al. (2013). "TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine." Cancer research. **15**;73(24):7162-7.
- Knowles, M. A. (2006). "Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?" Carcinogenesis **27**(3): 361-373.

- Korabecna, M. and V. Tesar (2017). "NETosis provides the link between activation of neutrophils on hemodialysis membrane and comorbidities in dialyzed patients." Inflammation Research **66**(5): 369-378.
- Koutova, L., et al. (2015). "The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients." Leukemia research **39**(12):1389-95.
- Kozomara, A., et al. (2018). "miRBase: from microRNA sequences to function." Nucleic acids research **47**(D1): D155-D162.
- Lagos-Quintana, M., et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.
- Lagos-Quintana, M., et al. (2003). "New microRNAs from mouse and human." Rna **9**(2): 175-179.
- Laktionov, P. P., et al. (2004). "Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients." Annals of the New York Academy of Sciences **1022**(1): 221-227.
- Lamba, V., et al. (2014). "Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation." BMC Res Notes **7**(1): 129.
- Lau, N. C., et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-862.
- Le, Y., et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415.
- Lee, R. C., et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." The EMBO journal **21**(17): 4663-4670.
- Lee, Y., et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." The EMBO journal **23**(20): 4051-4060.
- Leon, S., et al. (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." Cancer research **37**(3): 646-650.

Lewis, B. P., et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Lin, T., et al. (2009). "MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer." The Journal of Urology **181**(3): 1372-1380.

Llave, C., et al. (2002). "Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants." The Plant Cell **14**, 1605–1619

Lo, Y. D., et al. (2000). "Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients." Clinical chemistry **46**(3): 319-323.

Lo, Y. D., et al. (1999). "Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma." The American Journal of Human Genetics **64**(1): 218-224.

Lombardi, G. (2018). "Free Circulating miRNAs Measurement in Clinical Settings: The Still Unsolved Issue of the Normalization." Advances in clinical chemistry **87**: 113.

Lui, Y. Y., et al. (2002). "Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation." Clinical chemistry **48**(3): 421-427.

Lytle, J. R., et al. (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(23): 9667-9672.

Mahdavinezhad, A., et al. (2015 A). "Association between Tissue miR-141, miR-200c and miR-30b and Bladder Cancer: A Matched Case-Control Study." Urology Journal **12**(1): 2010-2013.

Mahdavinezhad, A., et al. (2015 B). "Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer." International Journal of Molecular and Cellular Medicine **4**(1): 32.

Mandel, P. (1948). "Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme." Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales = Minutes of meetings of the Society of Biology and its Subsidiaries **142**: 241-243.

Mearini, E., et al. (2017). "Expression of urinary miRNAs targeting NLRs inflammasomes in bladder cancer." OncoTargets and therapy **10**: 2665.

Meister, G., et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Molecular cell **15**(2): 185-197.

Mengual, L., et al. (2013). "Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer." International journal of cancer **133**(11): 2631-2641.

Miah, S., et al. (2012). "An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer." British journal of cancer **107**(1): 123.

Michailidi, C., et al. (2015). "Involvement of epigenetics and EMT related miRNA in arsenic induced neoplastic transformation and their potential clinical use." Cancer prevention research: canprevres. 0251.2014.

Mužík J., D. L., Babjuk M., Kubásek M., Fínek J., Petruželka L. (2007-2011). "Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit ". [online] Retrieved 22nd February 2016, 2016.

Nottrott, S., et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." Nature Structural and Molecular Biology **13**(12): 1108.

Ørntoft, T. F. and H. Wolf (1998). "Molecular alterations in bladder cancer." Urological Research **26**(4): 223-233.

Pardini, B., et al. (2018). "microRNA profiles in urine by next-generation sequencing can stratify bladder cancer subtypes." Oncotarget **9**(29): 20658.

Pasquinelli, A. E., et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." nature **408**(6808): 86-89.

Pazourkova, E., et al. (2016). Comparison of microRNA content in plasma and urine indicates the existence of a transrenal passage of selected microRNAs. Circulating Nucleic Acids in Serum and Plasma–CNAPS IX, Springer: 97-100.

Petersen, C. P., et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Molecular cell **21**(4): 533-542.

Piao, X. M., et al. (2018). "Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria." International journal of cancer **144**(2): 380-388.

- Pignot, G., et al. (2013). "microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer." International journal of cancer **132**(11): 2479-2491.
- Pillai, R. S., et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." Science **309**(5740): 1573-1576.
- Pisetsky, D. S. (2000). "Immune responses to DNA in normal and aberrant immunity." Immunologic research **22**(2-3): 119-126.
- Pospisilova, S., et al. (2016). "MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection." Neoplasma **63**(5): 799-808.
- Puerta-Gil, P., et al. (2012). "miR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer." The American journal of pathology **180**(5): 1808-1815.
- Rak, J. (2013). "Extracellular vesicles—biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer." Frontiers in pharmacology **4**: 21.
- Ratert, N., et al. (2014). "Reference miRNAs for miRNAome analysis of urothelial carcinomas." PloS one.
- Reinhart, B. J., et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." nature **403**(6772): 901-906.
- Renard, I., et al. (2010). "Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples." European urology **58**(1): 96-104.
- Rodriguez, A., et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome research **14**(10a): 1902-1910.
- Rogers, J. C., et al. (1972). "Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen." Proceedings of the National Academy of Sciences **69**(7): 1685-1689.
- Roy, A., et al. (2014). "Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis." Bmj **349**: g4643.

Rupaimoole, R. and F. J. Slack (2017). "MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases." Nature reviews Drug discovery **16**(3): 203.

Sapre, N., et al. (2016). "A urinary microRNA signature can predict the presence of bladder urothelial carcinoma in patients undergoing surveillance." British journal of cancer **114**(4): 454.

Sasaki, H., et al. (2016). "Expression level of urinary MicroRNA-146a-5p is increased in patients with bladder cancer and decreased in those after transurethral resection." Clinical genitourinary cancer **14**(5): e493-e499.

Schnall-Levin, M., et al. (2010). "Conserved microRNA targeting in Drosophila is as widespread in coding regions as in 3' UTRs." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(36): 15751-15756.

Schwarz, D. S., et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.

Snowdon, J., et al. (2013). "A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer." Canadian Urological Association Journal **7**(1-2): 28.

Sobin, L. H., et al. (2011). TNM classification of malignant tumours, John Wiley & Sons.

Steinman, C. R. (1975). "Free DNA in serum and plasma from normal adults." Journal of Clinical Investigation **56**(2): 512.

Sterbova, M., et al. (2019). "The use of Human Inflammatory Response and Autoimmunity RT2 lncRNA PCR Array for plasma examination in breast cancer patients prior to therapy." Neoplasma **2019** Mar 31.

Street, J., et al. (2017). Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers. Advances in clinical chemistry, Elsevier. **78**: 103-122.

Streleckiene, G., et al. (2018). "Quantifying cell free DNA in urine: comparison between commercial kits, impact of gender and inter-individual variation." BioTechniques **64**(5): 225-230.

Stroun, M. and P. Anker (1972). "Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles." Biochemical Journal **128**(3): 100P.

Stroun, M., et al. (1987). "Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients." European Journal of Cancer and Clinical Oncology **23**(6): 707-712.

Stroun, M., et al. (2001 A). "Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA." Annals of the New York Academy of Sciences **945**(1): 258-264.

Stroun, M., et al. (2001 B). "About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release." Clinica Chimica Acta **313**(1): 139-142.

Su, Y.-H., et al. (2004). "Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer." The Journal of Molecular Diagnostics **6**(2): 101-107.

Suzuki, N., et al. (2008). "Characterization of circulating DNA in healthy human plasma." Clinica Chimica Acta **387**(1): 55-58.

Svobodová, I., et al. (2016). "Differentially expressed miRNAs in trisomy 21 placentas." Prenatal diagnosis **36**(8): 775-784.

Szarvas, T., et al. (2007). "Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: urine supernatant versus urine sediment." Oncology reports **18**(2): 405-409.

Tan, E., et al. (1966). "Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus." Journal of Clinical Investigation **45**(11): 1732.

Tang, K., et al. (2015). "A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **34**(1): 53-53.

Tay, Y., et al. (2008). "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation." nature **455**(7216): 1124-1128.

Tencer, J., et al. (1998). "Size-selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins: upper size limitations of shunt pathways." Kidney international **53**(3): 709-715.

Togneri, F. S., et al. (2016). "Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA." European Journal of Human Genetics **24**(8): 1167.



Tölle, A., et al. (2013). "Identification of microRNAs in blood and urine as tumour markers for the detection of urinary bladder cancer." Oncology reports **30**(4): 1949-1956.

Urquidi, V., et al. (2016). "A microRNA biomarker panel for the non-invasive detection of bladder cancer." Oncotarget **7**(52): 86290.

Van der Ree, M., et al. (2016). "Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased micro RNA-122 levels without affecting other micro RNA s in plasma." Alimentary pharmacology & therapeutics **43**(1): 102-113.

Van der Ree, M. H., et al. (2014). "Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients." Antiviral research **111**: 53-59.

Verweij, J. and H. M. Pinedo (1990). "Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations." Anticancer Drugs **1**(1): 5-13.

Wang, B. G., et al. (2003). "Increased plasma DNA integrity in cancer patients." Cancer research **63**(14): 3966-3968.

Wang, G., et al. (2012). "Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer." Clinical genitourinary cancer **10**(2): 106-113.

Wang, J., et al. (2015). "Downregulation of urinary cell-free microRNA-214 as a diagnostic and prognostic biomarker in bladder cancer." Journal of surgical oncology **111**(8): 992-999.

Wang, Y., et al. (2016). "An epigenetic biomarker combination of PCDH17 and POU4F2 detects bladder cancer accurately by methylation analyses of urine sediment DNA in Han Chinese." Oncotarget **7**(3): 2754.

Ward, D. G. and R. T. Bryan (2017). "Liquid biopsies for bladder cancer." Translational Andrology and Urology **6**(2): 331.

Weber, J. A., et al. (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clinical chemistry **56**(11): 1733-1741.

Wei, S., et al. (2015). "Higher Expression of miR-182 in Cytology Specimens of High-Grade Urothelial Cell Carcinoma: A Potential Diagnostic Marker." Acta Cytologica **59**(1): 103-106.

- Weisbach, L., et al. (2013). "Lymph node dissection during radical cystectomy for bladder cancer treatment: considerations on relevance and extent." International urology and nephrology **45**(6): 1561-1567.
- Wightman, B., et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans." Cell **75**(5): 855-862.
- Witjes, J. A., et al. (2014). "EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines." European urology **65**(4): 778-792.
- Wszolek, M. F., et al. (2011). "A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype." Urologic Oncology **29**(6): 794-801. e791.
- Wu, H., et al. (2000). "Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing." Journal of Biological Chemistry **275**(47): 36957-36965.
- Wu, T.-L., et al. (2002). "Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range." Clinica Chimica Acta **321**(1): 77-87.
- Yamada, Y., et al. (2011). "MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology." Cancer Science **102**(3): 522-529.
- Yao, W., et al. (2016). "Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: a qualitative study." Gene **590**(1): 142-148.
- Yasui, T., et al. (2017). "Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires." Science advances **3**(12): e1701133.
- Yeom, K.-H., et al. (2006). "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing." Nucleic acids research **34**(16): 4622-4629.
- Yi, R., et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes & development **17**(24): 3011-3016.
- Yoshino, H., et al. (2011). "The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer." British Journal of Cancer **104**(5): 808-818.
- Yun, S. J., et al. (2012). "Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer." International Journal of Oncology **41**(5): 1871-1878.

Zancan, M., et al. (2009). "Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis." The International journal of biological markers **24**(3): 147-155.

Zeng, Y., et al. (2003). "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(17): 9779-9784.

Zhang, D.-Z., et al. (2014). "Cell-free urinary microRNA-99a and microRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer." PloS one **9**.

Zhang, X., et al. (2016). "Direct quantitative detection for cell-free miR-155 in urine: a potential role in diagnosis and prognosis for non-muscle invasive bladder cancer." Oncotarget **7**(3): 3255.

Zhao, B.-S., et al. (2013). "Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **14**(1): 139-143.

Zhong, X. Y., et al. (2007). "Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations?" Annals of hematology **86**(2): 139-143.

Zhou, X., et al. (2014). "Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer." Medical Oncology **31**(10): 1-7.

Zinkova, A., et al. (2017). "Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response." Scientific Reports **7**(1): 2591.

## X Dodatek

*Tabulka 19: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)*

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
1	ath-miR159a	ath-miR159a
2	hsa-let-7a	hsa-let-7a-5p
3	hsa-let-7b	hsa-let-7b-5p
4	hsa-let-7c	hsa-let-7c-5p
5	hsa-let-7d	hsa-let-7d-5p
6	hsa-let-7e	hsa-let-7e-5p
7	hsa-let-7f	hsa-let-7f-5p
8	hsa-let-7g	hsa-let-7g-5p
9	hsa-miR-1	hsa-miR-1-3p
10	hsa-miR-100	hsa-miR-100-5p
11	hsa-miR-101	hsa-miR-101-3p
12	hsa-miR-103	hsa-miR-103a-3p
13	hsa-miR-105	hsa-miR-105-5p
14	hsa-miR-106a	hsa-miR-106a-5p
15	hsa-miR-106b	hsa-miR-106b-5p
16	hsa-miR-107	hsa-miR-107
17	hsa-miR-10a	hsa-miR-10a-5p
18	hsa-miR-10b	hsa-miR-10b-5p
19	hsa-miR-122	hsa-miR-122-5p
20	hsa-miR-124a	hsa-miR-124-3p
21	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-3p
22	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125a-5p
23	hsa-miR-125b	hsa-miR-125b-5p
24	hsa-miR-126	hsa-miR-126-3p
25	hsa-miR-127	hsa-miR-127-3p
26	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-127-5p
27	hsa-miR-128a	hsa-miR-128-3p
28	hsa-miR-129	hsa-miR-129-5p
29	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129-2-3p
30	hsa-miR-130a	hsa-miR-130a-3p
31	hsa-miR-130b	hsa-miR-130b-3p
32	hsa-miR-132	hsa-miR-132-3p
33	hsa-miR-133a	hsa-miR-133a-3p
34	hsa-miR-133b	hsa-miR-133b

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 1: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
35	hsa-miR-134	hsa-miR-134-5p
36	hsa-miR-135a	hsa-miR-135a-5p
37	hsa-miR-135b	hsa-miR-135b-5p
38	hsa-miR-136	hsa-miR-136-5p
39	hsa-miR-137	hsa-miR-137
40	hsa-miR-138	hsa-miR-138-5p
41	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-3p
42	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-139-5p
43	hsa-miR-140	hsa-miR-140-5p
44	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-3p
45	hsa-miR-141	hsa-miR-141-3p
46	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-3p
47	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-142-5p
48	hsa-miR-143	hsa-miR-143-3p
49	hsa-miR-145	hsa-miR-145-5p
50	hsa-miR-146a	hsa-miR-146a-5p
51	hsa-miR-146b	hsa-miR-146b-5p
52	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-3p
53	hsa-miR-147	hsa-miR-147a
54	hsa-miR-147b	hsa-miR-147b
55	hsa-miR-148a	hsa-miR-148a-3p
56	hsa-miR-148b	hsa-miR-148b-3p
57	hsa-miR-149	hsa-miR-149-5p
58	hsa-miR-150	hsa-miR-150-5p
59	hsa-miR-152	hsa-miR-152-3p
60	hsa-miR-153	hsa-miR-153-3p
61	hsa-miR-154	hsa-miR-154-5p
62	hsa-miR-155	hsa-miR-155-5p
63	hsa-miR-15a	hsa-miR-15a-5p
64	hsa-miR-15b	hsa-miR-15b-5p
65	hsa-miR-16	hsa-miR-16-5p
66	hsa-miR-17	hsa-miR-17-5p
67	hsa-miR-181a	hsa-miR-181a-5p
68	hsa-miR-181c	hsa-miR-181c-5p
69	hsa-miR-182	hsa-miR-182-5p
70	hsa-miR-183	hsa-miR-183-5p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 2: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
71	hsa-miR-184	hsa-miR-184
72	hsa-miR-185	hsa-miR-185-5p
73	hsa-miR-186	hsa-miR-186-5p
74	hsa-miR-187	hsa-miR-187-3p
75	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-188-3p
76	hsa-miR-18a	hsa-miR-18a-5p
77	hsa-miR-18b	hsa-miR-18b-5p
78	hsa-miR-190	hsa-miR-190a-5p
79	hsa-miR-191	hsa-miR-191-5p
80	hsa-miR-192	hsa-miR-192-5p
81	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-3p
82	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193a-5p
83	hsa-miR-193b	hsa-miR-193b-3p
84	hsa-miR-194	hsa-miR-194-5p
85	hsa-miR-195	hsa-miR-195-5p
86	hsa-miR-196b	hsa-miR-196b-5p
87	hsa-miR-197	hsa-miR-197-3p
88	hsa-miR-198	hsa-miR-198
89	hsa-miR-199a	hsa-miR-199a-5p
90	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199a-3p hsa-miR-199b-3p
91	hsa-miR-199b	hsa-miR-199b-5p
92	hsa-miR-19a	hsa-miR-19a-3p
93	hsa-miR-19b	hsa-miR-19b-3p
94	hsa-miR-200a	hsa-miR-200a-3p
95	hsa-miR-200b	hsa-miR-200b-3p
96	hsa-miR-200c	hsa-miR-200c-3p
97	hsa-miR-202	hsa-miR-202-3p
98	hsa-miR-203	hsa-miR-203a-3p
99	hsa-miR-204	hsa-miR-204-5p
100	hsa-miR-205	hsa-miR-205-5p
101	hsa-miR-208	hsa-miR-208a-3p
102	hsa-miR-208b	hsa-miR-208b-3p
103	hsa-miR-20a	hsa-miR-20a-5p
104	hsa-miR-20b	hsa-miR-20b-5p
105	hsa-miR-21	hsa-miR-21-5p

*Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 3: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)*

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
106	hsa-miR-210	hsa-miR-210-3p
107	hsa-miR-211	hsa-miR-211-5p
108	hsa-miR-212	hsa-miR-212-3p
109	hsa-miR-214	hsa-miR-214-3p
110	hsa-miR-215	hsa-miR-215-5p
111	hsa-miR-216a	hsa-miR-216a-5p
112	hsa-miR-216b	hsa-miR-216b-5p
113	hsa-miR-217	hsa-miR-217
114	hsa-miR-218	hsa-miR-218-5p
115	hsa-miR-219	hsa-miR-219a-5p
116	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219a-1-3p
117	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-219a-2-3p
118	hsa-miR-22	hsa-miR-22-3p
119	hsa-miR-220	hsa-miR-220
120	hsa-miR-220b	hsa-miR-220b
121	hsa-miR-220c	hsa-miR-220c
122	hsa-miR-221	hsa-miR-221-3p
123	hsa-miR-222	hsa-miR-222-3p
124	hsa-miR-223	hsa-miR-223-3p
125	hsa-miR-224	hsa-miR-224-5p
126	hsa-miR-23a	hsa-miR-23a-3p
127	hsa-miR-23b	hsa-miR-23b-3p
128	hsa-miR-24	hsa-miR-24-3p
129	hsa-miR-25	hsa-miR-25-3p
130	hsa-miR-26a	hsa-miR-26a-5p
131	hsa-miR-26b	hsa-miR-26b-5p
132	hsa-miR-27a	hsa-miR-27a-3p
133	hsa-miR-27b	hsa-miR-27b-3p
134	hsa-miR-28	hsa-miR-28-5p
135	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-3p
136	hsa-miR-296	hsa-miR-296-5p
137	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-3p
138	hsa-miR-298	hsa-miR-298
139	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-3p
140	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-299-5p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 4: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
141	hsa-miR-29a	hsa-miR-29a-3p
142	hsa-miR-29b	hsa-miR-29b-3p
143	hsa-miR-29c	hsa-miR-29c-3p
144	hsa-miR-301	hsa-miR-301a-3p
145	hsa-miR-301b	hsa-miR-301b-3p
146	hsa-miR-302a	hsa-miR-302a-3p
147	hsa-miR-302b	hsa-miR-302b-3p
148	hsa-miR-302c	hsa-miR-302c-3p
149	hsa-miR-30b	hsa-miR-30b-5p
150	hsa-miR-30c	hsa-miR-30c-5p
151	hsa-miR-31	hsa-miR-31-5p
152	hsa-miR-32	hsa-miR-32-5p
153	hsa-miR-320	hsa-miR-320a
154	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-323a-3p
155	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-3p
156	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-324-5p
157	hsa-miR-325	hsa-miR-325
158	hsa-miR-326	hsa-miR-326
159	hsa-miR-328	hsa-miR-328-3p
160	hsa-miR-329	hsa-miR-329-3p
161	hsa-miR-330	hsa-miR-330-3p
162	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-330-5p
163	hsa-miR-331	hsa-miR-331-3p
164	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-331-5p
165	hsa-miR-335	hsa-miR-335-5p
166	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-337-5p
167	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-338-3p
168	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-3p
169	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-339-5p
170	hsa-miR-33b	hsa-miR-33b-5p
171	hsa-miR-340	hsa-miR-340-5p
172	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-3p
173	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-342-5p
174	hsa-miR-345	hsa-miR-345-5p
175	hsa-miR-346	hsa-miR-346



Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 5: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
176	hsa-miR-34a	hsa-miR-34a-5p
177	hsa-miR-34c	hsa-miR-34c-5p
178	hsa-miR-361	hsa-miR-361-5p
179	hsa-miR-362	hsa-miR-362-5p
180	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-3p
181	hsa-miR-363	hsa-miR-363-3p
182	hsa-miR-365	hsa-miR-365a-3p hsa-miR-365b-3p
183	hsa-miR-367	hsa-miR-367-3p
184	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-3p
185	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-369-5p
186	hsa-miR-370	hsa-miR-370-3p
187	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-371a-3p
188	hsa-miR-372	hsa-miR-372-3p
189	hsa-miR-373	hsa-miR-373-3p
190	hsa-miR-374	hsa-miR-374a-5p
191	hsa-miR-374-5p	hsa-miR-374b-5p
192	hsa-miR-375	hsa-miR-375
193	hsa-miR-376a	hsa-miR-376a-3p
194	hsa-miR-376b	hsa-miR-376b-3p
195	hsa-miR-376c	hsa-miR-376c-3p
196	hsa-miR-377	hsa-miR-377-3p
197	hsa-miR-379	hsa-miR-379-5p
198	hsa-miR-380-3p	hsa-miR-380-3p
199	hsa-miR-381	hsa-miR-381-3p
200	hsa-miR-382	hsa-miR-382-5p
201	hsa-miR-383	hsa-miR-383-5p
202	hsa-miR-384	hsa-miR-384
203	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-409-5p
204	hsa-miR-410	hsa-miR-410-3p
205	hsa-miR-411	hsa-miR-411-5p
206	hsa-miR-412	hsa-miR-412-3p
207	hsa-miR-422a	hsa-miR-422a
208	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-423-5p
209	hsa-miR-424	hsa-miR-424-5p
210	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-425-5p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 6: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
211	hsa-miR-429	hsa-miR-429
212	hsa-miR-431	hsa-miR-431-5p
213	hsa-miR-433	hsa-miR-433-3p
214	hsa-miR-448	hsa-miR-448
215	hsa-miR-449	hsa-miR-449a
216	hsa-miR-449b	hsa-miR-449b-5p
217	hsa-miR-450a	hsa-miR-450a-5p
218	hsa-miR-450b-3p	hsa-miR-450b-3p
219	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-450b-5p
220	hsa-miR-451	hsa-miR-451a
221	hsa-miR-452	hsa-miR-452-5p
222	hsa-miR-453	hsa-miR-323b-5p
223	hsa-miR-454	hsa-miR-454-3p
224	hsa-miR-455	hsa-miR-455-5p
225	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-3p
226	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-483-5p
227	hsa-miR-484	hsa-miR-484
228	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-3p
229	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-485-5p
230	hsa-miR-486	hsa-miR-486-5p
231	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-3p
232	hsa-miR-487a	hsa-miR-487a-3p
233	hsa-miR-487b	hsa-miR-487b-3p
234	hsa-miR-488	hsa-miR-488-3p
235	hsa-miR-489	hsa-miR-489-3p
236	hsa-miR-490	hsa-miR-490-3p
237	hsa-miR-491	hsa-miR-491-5p
238	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-3p
239	hsa-miR-492	hsa-miR-492
240	hsa-miR-493	hsa-miR-493-3p
241	hsa-miR-494	hsa-miR-494-3p
242	hsa-miR-495	hsa-miR-495-3p
243	hsa-miR-496	hsa-miR-496
244	hsa-miR-499	hsa-miR-499a-5p
245	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499a-3p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 7: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	Jméno Assaye	miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno
246	hsa-miR-500	hsa-miR-500a-5p
247	hsa-miR-501	hsa-miR-501-5p
248	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-3p
249	hsa-miR-502	hsa-miR-502-5p
250	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-3p
251	hsa-miR-503	hsa-miR-503-5p
252	hsa-miR-504	hsa-miR-504-5p
253	hsa-miR-505	hsa-miR-505-3p
254	hsa-miR-506	hsa-miR-506-3p
255	hsa-miR-507	hsa-miR-507
256	hsa-miR-508	hsa-miR-508-3p
257	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-508-5p
258	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-509-3-5p
259	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-509-5p
260	hsa-miR-510	hsa-miR-510-5p
261	hsa-miR-511	hsa-miR-511-5p
262	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-3p
263	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-512-5p
264	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-513a-5p
265	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-3p
266	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-515-5p
267	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516a-5p
268	hsa-miR-516b	hsa-miR-516b-5p
269	hsa-miR-517a	hsa-miR-517a-3p hsa-miR-517b-3p
270	hsa-miR-517b	ppy-miR-517b
271	hsa-miR-517c	hsa-miR-517c-3p
272	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-3p
273	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518a-5p hsa-miR-527
274	hsa-miR-518b	hsa-miR-518b
275	hsa-miR-518c	hsa-miR-518c-3p
276	hsa-miR-518d	hsa-miR-518d-3p
277	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518d-5p hsa-miR-520c-5p hsa-miR-526a
278	hsa-miR-518e	hsa-miR-518e-3p
279	hsa-miR-518f	hsa-miR-518f-3p
280	hsa-miR-519a	hsa-miR-519a-3p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 8: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
281	hsa-miR-519c	hsa-miR-519c-3p
282	hsa-miR-519d	hsa-miR-519d-3p
283	hsa-miR-519e	hsa-miR-519e-3p
284	hsa-miR-520a	hsa-miR-520a-3p
285	hsa-miR-520a#	hsa-miR-520a-5p
286	hsa-miR-520b	hsa-miR-520b
287	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520d-5p
288	hsa-miR-520e	hsa-miR-520e
289	hsa-miR-520f	hsa-miR-520f-3p
290	hsa-miR-520 g	hsa-miR-520 g-3p
291	hsa-miR-521	hsa-miR-521
292	hsa-miR-522	hsa-miR-522-3p
293	hsa-miR-523	hsa-miR-523-3p
294	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-524-5p
295	hsa-miR-525	hsa-miR-525-5p
296	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-3p
297	hsa-miR-526b	hsa-miR-526b-5p
298	hsa-miR-532	hsa-miR-532-5p
299	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-3p
300	hsa-miR-539	hsa-miR-539-5p
301	hsa-miR-541	hsa-miR-541-3p
302	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-3p
303	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-542-5p
304	hsa-miR-544	hsa-miR-544a
305	hsa-miR-545	hsa-miR-545-3p
306	hsa-miR-548a	hsa-miR-548a-3p
307	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548a-5p
308	hsa-miR-548b	hsa-miR-548b-3p
309	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548b-5p
310	hsa-miR-548c	hsa-miR-548c-3p
311	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548am-5p hsa-miR-548c-5p hsa-miR-548o-5p
312	hsa-miR-548d	hsa-miR-548d-3p
313	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-548d-5p
314	hsa-miR-551b	hsa-miR-551b-3p
315	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-3p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 9: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
316	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-556-5p
317	hsa-miR-561	hsa-miR-561-3p
318	hsa-miR-570	hsa-miR-570-3p
319	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-574-3p
320	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-3p
321	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-576-5p
322	hsa-miR-579	hsa-miR-579-3p
323	hsa-miR-582-3p	hsa-miR-582-3p
324	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-582-5p
325	hsa-miR-589	hsa-miR-589-5p
326	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-590-5p
327	hsa-miR-597	hsa-miR-597-5p
328	hsa-miR-598	hsa-miR-598-3p
329	hsa-miR-615	hsa-miR-615-3p
330	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-615-5p
331	hsa-miR-616	hsa-miR-616-3p
332	hsa-miR-618	hsa-miR-618
333	hsa-miR-624	hsa-miR-624-3p
334	hsa-miR-625	hsa-miR-625-5p
335	hsa-miR-627	hsa-miR-627-5p
336	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-628-5p
337	hsa-miR-629	hsa-miR-629-5p
338	hsa-miR-636	hsa-miR-636
339	hsa-miR-642	hsa-miR-642a-5p
340	hsa-miR-651	hsa-miR-651-5p
341	hsa-miR-652	hsa-miR-652-3p
342	hsa-miR-653	hsa-miR-653-5p
343	hsa-miR-654	hsa-miR-654-5p
344	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-3p
345	hsa-miR-655	hsa-miR-655-3p
346	hsa-miR-660	hsa-miR-660-5p
347	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-671-3p
348	hsa-miR-672	hsa-miR-672
349	hsa-miR-674	hsa-miR-674
350	hsa-miR-708	hsa-miR-708-5p

Tabulka 19 – POKRAČOVÁNÍ 10: Abecedně řazený seznam miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA)

	<b>Jméno Assaye</b>	<b>miRBase ID (v21) nebo NCBI jméno</b>
351	hsa-miR-744	hsa-miR-744-5p
352	hsa-miR-758	hsa-miR-758-3p
353	hsa-miR-871	mmu-miR-871-5p
354	hsa-miR-872	hsa-miR-872
355	hsa-miR-873	hsa-miR-873-5p
356	hsa-miR-874	hsa-miR-874-3p
357	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-875-3p
358	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-3p
359	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-876-5p
360	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-3p
361	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-885-5p
362	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-3p
363	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-886-5p
364	hsa-miR-887	hsa-miR-887-3p
365	hsa-miR-888	hsa-miR-888-5p
366	hsa-miR-889	hsa-miR-889-3p
367	hsa-miR-890	hsa-miR-890
368	hsa-miR-891a	hsa-miR-891a-5p
369	hsa-miR-891b	hsa-miR-891b
370	hsa-miR-892a	hsa-miR-892a
371	hsa-miR-9	hsa-miR-9-5p
372	hsa-miR-92a	hsa-miR-92a-3p
373	hsa-miR-93	hsa-miR-93-5p
374	hsa-miR-95	hsa-miR-95-3p
375	hsa-miR-96	hsa-miR-96-5p
376	hsa-miR-98	hsa-miR-98-5p
377	hsa-miR-99a	hsa-miR-99a-5p
378	hsa-miR-99b	hsa-miR-99b-5p
379	RNU44	RNU44
380	RNU48	RNU48
381	U6 snRNA	U6 snRNA

TaqMan® Array Human MicroRNA Card A v2

	hsa-let -7a	hsa-let -7c	hsa-let -7d	hsa-let -7e	hsa-let -7f	hsa-let -7g	hsa-miR -1	hsa-miR -9	hsa-miR -10a	hsa-miR -10b	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR -15a	hsa-miR -15b	hsa-miR -16	hsa-miR -17	hsa-miR -18a	hsa-miR -18b	hsa-miR -18c	hsa-miR -19a	hsa-miR -19b	hsa-miR -20a	hsa-miR -20b	hsa-miR -21	hsa-miR -22
1	hsa-miR -23a	hsa-miR -23b	hsa-miR -24	hsa-miR -25	hsa-miR -26a	hsa-miR -26b	hsa-miR -27a	hsa-miR -27b	hsa-miR -28-3p	hsa-miR -28-5p	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR -29a	hsa-miR -29b	hsa-miR -29c	hsa-miR -30c	hsa-miR -30d	hsa-miR -31	hsa-miR -32	hsa-miR -33a	hsa-miR -33b	hsa-miR -34a	hsa-miR -34c-5p	hsa-miR -32a	hsa-miR -93
2	hsa-miR -95	hsa-miR -130a	hsa-miR -132	hsa-miR -133a	hsa-miR -133b	hsa-miR -98b	hsa-miR -100	hsa-miR -101	hsa-miR -105	hsa-miR -106a	hsa-miR -106b	hsa-miR -106c	hsa-miR -107	hsa-miR -122	hsa-miR -124	hsa-miR -125a-3p	hsa-miR -125a-5p	hsa-miR -125b	hsa-miR -126	hsa-miR -127-3p	hsa-miR -127-5p	hsa-miR -128	hsa-miR -129-5p	hsa-miR -146a	hsa-miR -147b
3	hsa-miR -148a	hsa-miR -148b	hsa-miR -149	hsa-miR -150	hsa-miR -152	hsa-miR -153	hsa-miR -154	hsa-miR -155	hsa-miR -181a	hsa-miR -181c	hsa-miR -182	hsa-miR -183	hsa-miR -184	hsa-miR -185	hsa-miR -186	hsa-miR -187	hsa-miR -188-3p	hsa-miR -188-5p	hsa-miR -190	hsa-miR -191	hsa-miR -192	hsa-miR -193a-3p	hsa-miR -193a-5p	hsa-miR -193b	hsa-miR -194
4	hsa-miR -195	hsa-miR -196b	hsa-miR -197	hsa-miR -198	hsa-miR -199a-5p	hsa-miR -199a-3p	hsa-miR -199b-5p	hsa-miR -200a	hsa-miR -200b	hsa-miR -200c	hsa-miR -202	hsa-miR -203	hsa-miR -204	hsa-miR -205	hsa-miR -206b	hsa-miR -210	hsa-miR -214	hsa-miR -215	hsa-miR -216a	hsa-miR -217	hsa-miR -218	hsa-miR -219-5p	hsa-miR -221	hsa-miR -221	hsa-miR -221
5	hsa-miR -222	hsa-miR -223	hsa-miR -224	hsa-miR -225	hsa-miR -226	hsa-miR -227	hsa-miR -228	hsa-miR -229	hsa-miR -230a	hsa-miR -230b	hsa-miR -230c	hsa-miR -230d	hsa-miR -230e	hsa-miR -230f	hsa-miR -230g	hsa-miR -230h	hsa-miR -230i	hsa-miR -230j	hsa-miR -230k	hsa-miR -230l	hsa-miR -230m	hsa-miR -230n	hsa-miR -230o	hsa-miR -230p	hsa-miR -230q
6	hsa-miR -335	hsa-miR -337-5p	hsa-miR -338-3p	hsa-miR -339-3p	hsa-miR -339-5p	hsa-miR -340	hsa-miR -341	hsa-miR -342	hsa-miR -343	hsa-miR -344	hsa-miR -345	hsa-miR -346	hsa-miR -347	hsa-miR -348	hsa-miR -349	hsa-miR -350	hsa-miR -351	hsa-miR -352	hsa-miR -353	hsa-miR -354	hsa-miR -355	hsa-miR -356	hsa-miR -357	hsa-miR -358	
7	hsa-miR -374b	hsa-miR -375	hsa-miR -376a	hsa-miR -376b	hsa-miR -377	hsa-miR -378	hsa-miR -379	hsa-miR -380	hsa-miR -381	hsa-miR -382	hsa-miR -383	hsa-miR -384	hsa-miR -385-3p	hsa-miR -385-5p	hsa-miR -386	hsa-miR -387	hsa-miR -388	hsa-miR -389	hsa-miR -390	hsa-miR -391	hsa-miR -392	hsa-miR -393	hsa-miR -394	hsa-miR -395	
8	hsa-miR -450b-5p	hsa-miR -451	hsa-miR -452	hsa-miR -453	hsa-miR -454	hsa-miR -455-3p	hsa-miR -455-5p	hsa-miR -456	hsa-miR -457	hsa-miR -458	hsa-miR -459	hsa-miR -460	hsa-miR -461	hsa-miR -462	hsa-miR -463	hsa-miR -464	hsa-miR -465	hsa-miR -466	hsa-miR -467	hsa-miR -468	hsa-miR -469	hsa-miR -470	hsa-miR -471	hsa-miR -472	
9	hsa-miR -499-3p	hsa-miR -499-5p	hsa-miR -500	hsa-miR -501-3p	hsa-miR -501-5p	hsa-miR -502-3p	hsa-miR -502-5p	hsa-miR -503	hsa-miR -504	hsa-miR -505	hsa-miR -506	hsa-miR -507	hsa-miR -508	hsa-miR -509	hsa-miR -510	hsa-miR -511	hsa-miR -512-3p	hsa-miR -512-5p	hsa-miR -513	hsa-miR -514	hsa-miR -515-3p	hsa-miR -515-5p	hsa-miR -516	hsa-miR -517c	
10	hsa-miR -518a-3p	hsa-miR -518a-5p	hsa-miR -518b	hsa-miR -518c	hsa-miR -518d	hsa-miR -518e	hsa-miR -518f	hsa-miR -518g	hsa-miR -518h	hsa-miR -518i	hsa-miR -518j	hsa-miR -518k	hsa-miR -518l	hsa-miR -518m	hsa-miR -518n	hsa-miR -518o	hsa-miR -518p	hsa-miR -518q	hsa-miR -518r	hsa-miR -518s	hsa-miR -518t	hsa-miR -518u	hsa-miR -518v	hsa-miR -518w	
11	hsa-miR -539	hsa-miR -541	hsa-miR -542-3p	hsa-miR -542-5p	hsa-miR -543	hsa-miR -544	hsa-miR -545	hsa-miR -546	hsa-miR -547	hsa-miR -548	hsa-miR -549	hsa-miR -550	hsa-miR -551	hsa-miR -552	hsa-miR -553	hsa-miR -554	hsa-miR -555	hsa-miR -556	hsa-miR -557	hsa-miR -558	hsa-miR -559	hsa-miR -560	hsa-miR -561	hsa-miR -562	
12	hsa-miR -582-5p	hsa-miR -589	hsa-miR -590-5p	hsa-miR -591	hsa-miR -592	hsa-miR -593	hsa-miR -594	hsa-miR -595	hsa-miR -596	hsa-miR -597	hsa-miR -598	hsa-miR -599	hsa-miR -600	hsa-miR -601	hsa-miR -602	hsa-miR -603	hsa-miR -604	hsa-miR -605	hsa-miR -606	hsa-miR -607	hsa-miR -608	hsa-miR -609	hsa-miR -610	hsa-miR -611	
13	hsa-miR -672	hsa-miR -674	hsa-miR -708	hsa-miR -744	hsa-miR -758	hsa-miR -771	hsa-miR -772	hsa-miR -773	hsa-miR -774	hsa-miR -775	hsa-miR -776	hsa-miR -777	hsa-miR -778	hsa-miR -779	hsa-miR -780	hsa-miR -781	hsa-miR -782	hsa-miR -783	hsa-miR -784	hsa-miR -785	hsa-miR -786	hsa-miR -787	hsa-miR -788	hsa-miR -789	
14	hsa-miR -820	hsa-miR -821	hsa-miR -822	hsa-miR -823	hsa-miR -824	hsa-miR -825	hsa-miR -826	hsa-miR -827	hsa-miR -828	hsa-miR -829	hsa-miR -830	hsa-miR -831	hsa-miR -832	hsa-miR -833	hsa-miR -834	hsa-miR -835	hsa-miR -836	hsa-miR -837	hsa-miR -838	hsa-miR -839	hsa-miR -840	hsa-miR -841	hsa-miR -842	hsa-miR -843	
15	hsa-miR -892a	hsa-miR -892b	hsa-miR -892c	hsa-miR -892d	hsa-miR -892e	hsa-miR -892f	hsa-miR -892g	hsa-miR -892h	hsa-miR -892i	hsa-miR -892j	hsa-miR -892k	hsa-miR -892l	hsa-miR -892m	hsa-miR -892n	hsa-miR -892o	hsa-miR -892p	hsa-miR -892q	hsa-miR -892r	hsa-miR -892s	hsa-miR -892t	hsa-miR -892u	hsa-miR -892v	hsa-miR -892w	hsa-miR -892x	
16	hsa-miR -920	hsa-miR -921	hsa-miR -922	hsa-miR -923	hsa-miR -924	hsa-miR -925	hsa-miR -926	hsa-miR -927	hsa-miR -928	hsa-miR -929	hsa-miR -930	hsa-miR -931	hsa-miR -932	hsa-miR -933	hsa-miR -934	hsa-miR -935	hsa-miR -936	hsa-miR -937	hsa-miR -938	hsa-miR -939	hsa-miR -940	hsa-miR -941	hsa-miR -942	hsa-miR -943	
17	hsa-miR -944	hsa-miR -945	hsa-miR -946	hsa-miR -947	hsa-miR -948	hsa-miR -949	hsa-miR -950	hsa-miR -951	hsa-miR -952	hsa-miR -953	hsa-miR -954	hsa-miR -955	hsa-miR -956	hsa-miR -957	hsa-miR -958	hsa-miR -959	hsa-miR -960	hsa-miR -961	hsa-miR -962	hsa-miR -963	hsa-miR -964	hsa-miR -965	hsa-miR -966	hsa-miR -967	
18	hsa-miR -968	hsa-miR -969	hsa-miR -970	hsa-miR -971	hsa-miR -972	hsa-miR -973	hsa-miR -974	hsa-miR -975	hsa-miR -976	hsa-miR -977	hsa-miR -978	hsa-miR -979	hsa-miR -980	hsa-miR -981	hsa-miR -982	hsa-miR -983	hsa-miR -984	hsa-miR -985	hsa-miR -986	hsa-miR -987	hsa-miR -988	hsa-miR -989	hsa-miR -990	hsa-miR -991	
19	hsa-miR -992	hsa-miR -993	hsa-miR -994	hsa-miR -995	hsa-miR -996	hsa-miR -997	hsa-miR -998	hsa-miR -999	hsa-miR -1000	hsa-miR -1001	hsa-miR -1002	hsa-miR -1003	hsa-miR -1004	hsa-miR -1005	hsa-miR -1006	hsa-miR -1007	hsa-miR -1008	hsa-miR -1009	hsa-miR -1010	hsa-miR -1011	hsa-miR -1012	hsa-miR -1013	hsa-miR -1014	hsa-miR -1015	
20	hsa-miR -1016	hsa-miR -1017	hsa-miR -1018	hsa-miR -1019	hsa-miR -1020	hsa-miR -1021	hsa-miR -1022	hsa-miR -1023	hsa-miR -1024	hsa-miR -1025	hsa-miR -1026	hsa-miR -1027	hsa-miR -1028	hsa-miR -1029	hsa-miR -1030	hsa-miR -1031	hsa-miR -1032	hsa-miR -1033	hsa-miR -1034	hsa-miR -1035	hsa-miR -1036	hsa-miR -1037	hsa-miR -1038	hsa-miR -1039	
21	hsa-miR -1040	hsa-miR -1041	hsa-miR -1042	hsa-miR -1043	hsa-miR -1044	hsa-miR -1045	hsa-miR -1046	hsa-miR -1047	hsa-miR -1048	hsa-miR -1049	hsa-miR -1050	hsa-miR -1051	hsa-miR -1052	hsa-miR -1053	hsa-miR -1054	hsa-miR -1055	hsa-miR -1056	hsa-miR -1057	hsa-miR -1058	hsa-miR -1059	hsa-miR -1060	hsa-miR -1061	hsa-miR -1062	hsa-miR -1063	
22	hsa-miR -1064	hsa-miR -1065	hsa-miR -1066	hsa-miR -1067	hsa-miR -1068	hsa-miR -1069	hsa-miR -1070	hsa-miR -1071	hsa-miR -1072	hsa-miR -1073	hsa-miR -1074	hsa-miR -1075	hsa-miR -1076	hsa-miR -1077	hsa-miR -1078	hsa-miR -1079	hsa-miR -1080	hsa-miR -1081	hsa-miR -1082	hsa-miR -1083	hsa-miR -1084	hsa-miR -1085	hsa-miR -1086	hsa-miR -1087	
23	hsa-miR -1088	hsa-miR -1089	hsa-miR -1090	hsa-miR -1091	hsa-miR -1092	hsa-miR -1093	hsa-miR -1094	hsa-miR -1095	hsa-miR -1096	hsa-miR -1097	hsa-miR -1098	hsa-miR -1099	hsa-miR -1100	hsa-miR -1101	hsa-miR -1102	hsa-miR -1103	hsa-miR -1104	hsa-miR -1105	hsa-miR -1106	hsa-miR -1107	hsa-miR -1108	hsa-miR -1109	hsa-miR -1110	hsa-miR -1111	
24	hsa-miR -1112	hsa-miR -1113	hsa-miR -1114	hsa-miR -1115	hsa-miR -1116	hsa-miR -1117	hsa-miR -1118	hsa-miR -1119	hsa-miR -1120	hsa-miR -1121	hsa-miR -1122	hsa-miR -1123	hsa-miR -1124	hsa-miR -1125	hsa-miR -1126	hsa-miR -1127	hsa-miR -1128	hsa-miR -1129	hsa-miR -1130	hsa-miR -1131	hsa-miR -1132	hsa-miR -1133	hsa-miR -1134	hsa-miR -1135	
25	hsa-miR -1136	hsa-miR -1137	hsa-miR -1138	hsa-miR -1139	hsa-miR -1140	hsa-miR -1141	hsa-miR -1142	hsa-miR -1143	hsa-miR -1144	hsa-miR -1145	hsa-miR -1146	hsa-miR -1147	hsa-miR -1148	hsa-miR -1149	hsa-miR -1150	hsa-miR -1151	hsa-miR -1152	hsa-miR -1153	hsa-miR -1154	hsa-miR -1155	hsa-miR -1156	hsa-miR -1157	hsa-miR -1158	hsa-miR -1159	
26	hsa-miR -1160	hsa-miR -1161	hsa-miR -1162	hsa-miR -1163	hsa-miR -1164	hsa-miR -1165	hsa-miR -1166	hsa-miR -1167	hsa-miR -1168	hsa-miR -1169	hsa-miR -1170	hsa-miR -1171	hsa-miR -1172	hsa-miR -1173	hsa-miR -1174	hsa-miR -1175	hsa-miR -1176	hsa-miR -1177	hsa-miR -1178	hsa-miR -1179	hsa-miR -1180	hsa-miR -1181	hsa-miR -1182	hsa-miR -1183	
27	hsa-miR -1184	hsa-miR -1185	hsa-miR -1186	hsa-miR -1187	hsa-miR -1188	hsa-miR -1189	hsa-miR -1190	hsa-miR -1191	hsa-miR -1192	hsa-miR -1193	hsa-miR -1194	hsa-miR -1195	hsa-miR -1196	hsa-miR -1197	hsa-miR -1198	hsa-miR -1199	hsa-miR -1200	hsa-miR -1201	hsa-miR -1202	hsa-miR -1203	hsa-miR -1204	hsa-miR -1205	hsa-miR -1206	hsa-miR -1207	
28	hsa-miR -1208	hsa-miR -1209	hsa-miR -1210	hsa-miR -1211	hsa-miR -1212	hsa-miR -1213	hsa-miR -1214	hsa-miR -1215	hsa-miR -1216	hsa-miR -1217	hsa-miR -1218	hsa-miR -1219	hsa-miR -1220	hsa-miR -1221	hsa-miR -1222	hsa-miR -1223	hsa-miR -1224	hsa-miR -1225	hsa-miR -1226	hsa-miR -1227	hsa-miR -1228	hsa-miR -1229	hsa-miR -1230	hsa-miR -1231	
29	hsa-miR -1232	hsa-miR -1233	hsa-miR -1234	hsa-miR -1235	hsa-miR -1236	hsa-miR -1237	hsa-miR -1238	hsa-miR -1239	hsa-miR -1240	hsa-miR -1241	hsa-miR -1242	hsa-miR -1243	hsa-miR -1244	hsa-miR -1245	hsa-miR -1246	hsa-miR -1247	hsa-miR -1248	hsa-miR -1249	hsa-miR -1250	hsa-miR -1251	hsa-miR -1252	hsa-miR -1253	hsa-miR -1254	hsa-miR -1255	
30	hsa-miR -1																								

Port

Obrázek 14: Rozložení miRNA na TaqMan® Array Human MicroRNA Card, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems™, CA, USA) (obrázek převzat zTaqMan® Array Human MicroRNA Cards, PRODUCT INFORMATION January 2010)

## XI Přílohy

### XI.1 Publikace které jsou podkladem dizertační práce